

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

Διδακτορική διατριβή

**Μοριακή και Βιοχημική Ανάλυση των Βακτηριακών  
Παρβουλινών και Κυκλοφιλινών**

Σκαγιά Δ. Αγγελική

Επιβλέπων Καθηγητής: Κατινάκης Παναγιώτης

Αθήνα 2016



Διδακτορική διατριβή:

Μοριακή και Βιοχημική Ανάλυση των Βακτηριακών  
Παρβουλινών και Κυκλοφιλινών

Σκαγιά Δ. Αγγελική

Επιβλέπων Καθηγητής: Κατινάκης Παναγιώτης

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Αναστασία Ταμπακάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Αντωνίου Πολυμνία, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Ζερβάκης Γεώργιος, Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Γεωργακόπουλος Δημήτριος, Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Δήμου Μαρία, Λέκτορας ΓΠΑ (Μέλος)



## Περίληψη

Οι πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομεράσες (ΡΡΙΑσες, EC: 5.2.1.8) αποτελούν μια υπεροικογένεια ενζύμων που καταλύουν την αργή διαδικασία της *cis/trans* ισομερίωσης των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται της προλίνης, σε διαφορετικά στάδια αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στόχων, ως ένζυμα που βοηθούν την αναδίπλωση. Οι πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομεράσες, είναι ένζυμα που απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς και σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα. Τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών διακρίνονται στις εξής οικογένειες: τις κυκλοφιλίνες (Cyclophilins), τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν το FK506 (FKBPs) και τις παρβουλίνες (Parvulins). Οι τρεις οικογένειες ΡΡΙΑσών έχουν διακριτά υποστρώματα ενώ έχουν αποδειχθεί ευαίσθητες σε διαφορετικούς τύπους αναστολέων. Η πλειονότητα των ΡΡΙΑσών, εκτός από την ενεργότητα ΡΡΙΑσης, εμφανίζουν και ενεργότητα τσαπερόνης μέσω της οποίας επιτελείται η αναδίπλωση πρωτεϊνών και παρεμποδίζεται η δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Επίσης, οι ΡΡΙΑσες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών όπως είναι η απόκριση θερμικού στρες, η μεταγραφή και η μετάφραση, η μεταγωγή σήματος, η μετάσταση όγκου, η μολυσματικότητα παθογόνων, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και άλλα. Οι βακτηριακές ΡΡΙΑσες ενώ δε φαίνεται να είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη υπό εργαστηριακές συνθήκες, έχουν σημαντικούς ρόλους στην επιβίωση σε ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός των μελών, δύο οικογενειών των ΡΡΙΑσών, των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών, του μικροοργανισμού *Escherichia coli*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του πλήρως αλληλουχημένου γονιδιώματος του βακτηρίου μέσω της οποίας εντοπίστηκαν τρία και δύο γονίδια αντίστοιχα, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ανήκουν στις παρβουλίνες και στις κυκλοφιλίνες. Ο φυσιολογικός ρόλος των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών μελετήθηκε μέσω της ανάπτυξης, σε διαφορετικές συνθήκες, των *E. coli* στελεχών *ΔppiC*, *ΔsurA*, *ΔppiD*, *ΔppiB* και *ΔppiA* στα οποία έχει απαλειφθεί το συγκεκριμένο γονίδιο. Η απουσία κάποιων παρβουλινών και κυκλοφιλινών 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.

Εξετάστηκε εάν η ενεργότητα ΡΡΙΑσης αυτών των ενζύμων εμπλέκεται στους παρατηρούμενους φαινότυπους. Για αυτό το σκοπό, δημιουργήθηκαν στελέχη τα οποία φέρουν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων που μετέχουν στον ενεργό κέντρο ΡΡΙΑσης κάθε πρωτεΐνης (PpiB<sub>F99A</sub>, PpiB<sub>R43A</sub>, PpiA<sub>F128A</sub>, PpiC<sub>C41A</sub>) και ελέγχθηκε εάν αυτά τα στελέχη συμπληρώνουν τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Η έκφραση των γονιδίων αγρίου τύπου αλλά και των μεταλλαγμένων γονιδίων των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη επανέφερε σε όλες τις περιπτώσεις τους φαινότυπους του στελέχους αγρίου τύπου. Εξαιρεση αποτέλεσε το μεταλλαγμένο γονίδιο της κυκλοφιλίνης PpiB<sub>R43A</sub>, όπου δεν επανέφερε το φαινότυπο του σχηματισμού βιοϋμενίου, υποδηλώνοντας τη αναγκαιότητα της δραστηριότητας ΡΡΙΑσης της κυκλοφιλίνης σε αυτή τη συμπεριφορά.

Ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔppiC*, *ΔsurA*, *ΔppiD*, *ΔppiB* και *ΔppiA* επανήλθε στα επίπεδα αγρίου τύπου μέσω υπερέκφρασης της πλειοψηφίας των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ΡΡΙΑσες 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 *ΔppiB* επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα έπειτα από την υπερέκφραση πρωτεϊνών που αποτελούν

πιθανούς στόχους της PpiB, των οποίων τα μεταλλαγμένα στελέχη σε αρκετές περιπτώσεις παρουσίασαν ανάλογους φαινότυπους με το στέλεχος  $\Delta ppiB$ . Επιβεβαιώθηκαν αρκετές αλληλεπιδράσεις των πιθανών πρωτεϊνών στόχων με την PpiB χρησιμοποιώντας διάφορες *in vivo* και *in vitro* μεθόδους αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις εμπλέκουν το ενεργό κέντρο PPIάσης της, αφού με την παρουσία των πιθανών αυτών στόχων παρατηρήθηκε μείωση της *in vitro* ενεργότητας PPIάσης της κυκλοφιλίνης. Στην περίπτωση, των DnaK, AccC και PtA βρέθηκε ότι η κυκλοφιλίνη διαδραματίζει έναν ρόλο στον άμεσο λειτουργικό έλεγχο αυτών των πρωτεϊνών, αφού η παρουσία της αυξάνει την μετρούμενη ενζυμική ενεργότητα της καθεμίας πρωτεΐνης. Επίσης, η PpiB εμπλέκεται στον υποκυτταρικό εντοπισμό της DnaK ενώ φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την ορθή αναδίπλωση της AccC.

Εξετάζοντας την κυτταρική μορφολογία των στελεχών που υπερεκφράζουν την κυκλοφιλίνη PpiB και την παρβουλίνη PpiC παρατηρήθηκε μια σημαντική κυτταρική επιμήκυνση, γεγονός που υποδηλώνει την εμπλοκή των παραπάνω ενζυμών στην κυτταρική διαίρεση. Αντίθετα, τα στελέχη τα οποία υπερεκφράζουν τα μεταλλαγμένα στο ενεργό κέντρο γονίδια,  $ppiB_{F99A}$ ,  $ppiB_{R43A}$  και  $ppiC_{C41A}$ , παρουσιάζουν κυτταρική μορφολογία όμοια με αυτή του αγρίου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργότητα PPIάσης των δυο πρωτεϊνών είναι αναγκαία. Επιπλέον, οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις FtsZ και ZipA πρωτεΐνες της κυτταρικής διαίρεσης. Η παρουσία της PpiB μειώνει τη ενεργότητα GTPάσης της FtsZ και έχει αρνητική επίδραση στη σωστή τοποθέτησή της στις μελλοντικές θέσεις διαίρεσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν τη συμμετοχή των PpiB και PpiC στην κυτταρική διαίρεση μέσω της λειτουργικής τους συσχέτισης με πρωτεΐνες άμεσα εμπλεκόμενες σε αυτήν τη διαδικασία.

*Λέξεις κλειδιά: cis/trans ισομερίωση, παρβουλίνες, κυκλοφιλίνες, Escherichia coli, ομαδική κίνηση σε επιφάνεια, κολυμβητική κίνηση, βιοϋμένιο.*

## Abstract

The peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases, EC 5.2.1.8) are enzymes that accelerate the slow *cis/trans* isomerization of peptidyl-prolyl bonds in different folding states of a target protein, while, they can also act on polypeptides, as folding helper enzymes. Prolyl isomerases are ubiquitous proteins, which are found in all organisms and all cellular compartments. At least three different families, cyclophilins, FK506-binding proteins (FKBPs) and parvulins constitute the enzyme class of PPIases. 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. PPIases have been found to take part in a great number of physiological processes such as heat shock response, transcription and translation, signal transduction, tumor metastasis, pathogen virulence, cell cycle control and others. Bacterial PPIases although appear to be non essential for growth under laboratory conditions they have significant roles in survival in environmental and pathogenic niches.

The main objective of the present study was to explore the biochemical and molecular function of the *Escherichia coli* parvulins and cyclophilins. Our goal was initially addressed through the analysis of the fully sequenced genome of *E. coli*, which revealed the existence of three and two members of the parvulins and cyclophilins, respectively. The physiological role of parvulins and cyclophilins of *E. coli* was exploited by examining the growth of strains  $\Delta ppiC$ ,  $\Delta surA$ ,  $\Delta ppiD$ ,  $\Delta ppiB$  and  $\Delta ppiA$ , lacking each PPIase gene, under various conditions. Characterization of parvulins and cyclophilins mutants revealed that the absence of some of these proteins resulted in pleiotropic phenotypes, including increased swarming and swimming motility in addition to enhanced biofilm formation.

We asked whether the prolyl isomerase activity of these enzymes is involved in the observed phenotypes. To this end, cyclophilin and parvulin proteins with PPIase active site mutations, (PpiB<sub>F99A</sub>, PpiB<sub>R43A</sub>, PpiA<sub>F128A</sub>, PpiC<sub>C41A</sub>) were constructed by site-directed mutagenesis and tested whether the resulting mutants complement the respective  $\Delta ppiB$ ,  $\Delta ppiA$  and  $\Delta ppiC$  strains under swimming, swarming and biofilm conditions. Complementation with cyclophilins and parvulins genes and also with the respective PPIase-deficient genes, restored the motility and sessility phenotypes, suggesting that PPIase activity seems to be unnecessary in these motile behaviors. The exception is PpiB<sub>R43A</sub>, where failed to rescue the biofilm phenotype, suggesting the involvement of PPIase activity in this behavior.

Furthermore, since PPIases constitute three convergently evolved gene families, we attempted to clarify the functional redundancy of the cyclophilins and parvulins with the other members of the three PPIases families. Multi-copy suppressor screens demonstrated that the expression of the majority of PPIase encoding genes restored swarming and swimming motility and biofilm formation of *E. coli* cyclophilins and parvulins mutant strains.

Moreover, the motility and sessility phenotype of PpiB mutant strain was restored by over-expressing several putative prey proteins which upon deletion are often characterized by analogous phenotypes. We were able to verify several interactions through various *in vivo* and *in vitro* interaction screens. Many of the interactions engage the PPIase active site, since in the presence of these putative prey proteins the *in vitro* catalytic activity of the enzyme was diminished. In the case of DnaK, AccC and Pta we also revealed a direct role of PpiB in the functional control of these proteins since it increased the measured enzyme activity of each protein and further interfered with DnaK localization and the correct folding of AccC.

Cells overexpressing *ppiB* and *ppiC* genes exhibited an elongated cell phenotype who failed to divide normally, unlikely to cells overexpressing the respective PPIase-deficient genes, indicating that PPIase activity of these proteins is affecting cell length. Additional, PpiB and PpiC are functionally associated with cell division of *E. coli*, since the two proteins interact with FtsZ and ZipA, two cell division proteins required for the formation of the Z ring. Furthermore, PpiB decreases the GTPase activity of FtsZ and when overexpressed shows an inhibitory effect on ITS proper localization at future division sites. Taken together, these results indicate that PpiB and PpiC are able to modulate bacterial cell division via its functional association with proteins directly related to the process.

*Keywords: cis/trans isomerization, parvulins, cyclophilins, Escherichia coli, swarming motility, swimming motility, biofilm.*



Η ανάθεση του θέματος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 12<sup>η</sup>/08.05.2012).

Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή ορίστηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 12<sup>η</sup>/08.05.2012) και αποτελείται από τους κ.κ.:

Κατινάκη Παναγιώτη, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή ορίστηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής (Συνεδρία 14.12.2015) σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 9, παρ. 4α του Ν.3685/08 και αποτελείται από τους κ.κ.:

Κατινάκη Παναγιώτη, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Αντωνίου Πολυμνία, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Ζερβάκη Γεώργιο, Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Γεωργακόπουλο Δημήτριο, Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Δήμου Μαρία, Λέκτορας ΓΠΑ (Μέλος)

*Η έγκριση της παρούσας διδακτορικής διατριβής από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών δεν δηλώνει την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν.5343/32 αρ.202 παρ.2).*



Στην οικογένειά μου



## Αντί προλόγου

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

Θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου εκτίμηση στον Καθηγητή κ Κατινάκη Παναγιώτη, για την ενθάρρυνση και την καθοδήγηση του όλα αυτά τα χρόνια και που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ υπό την εποπτεία του. Η εργασία υπό την επίβλεψη του υπήρξε πάντα πηγή έμπνευσης και τιμή. Τα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής: τον Επίκουρο Καθηγητή κ Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Ταμπακάκη Αναστασία για τις πολύτιμες συμβουλές και τη συνεχή υποστήριξη κατά την πραγματοποίηση της ερευνητικής διαδικασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στη Λέκτορα κα Δήμου Μαρία, για την επιστημονική καθοδήγηση της και την ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ Χατζόπουλο Πολυδεύκη και κ Φασσέα Κωνσταντίνο για την ευγενική παραχώρηση μέρους του εργαστηριακού τους εξοπλισμού. Όπως, και τις Διδάκτορα κα Βενιεράκη Αναστασία και Διδάκτορα κα Βεζύρη Έλενα για το ενδιαφέρον, τη βοήθεια και την παραγωγική συνεργασία.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την εκτίμησή μου προς τα άλλα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ Ζερβάκη Γεώργιο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ Γεωργακόπουλο Δημήτριο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αντωνίου Πολυμνία για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Είμαι ευγνώμων για τις συμβουλές, τη βοήθεια και τη φιλία των συναδέλφων μου στο εργαστήριο και ιδιαίτερα ευχαριστώ τη συνάδελφο Διδάκτορα Ζωγράφου Χρυσούλα για την αμέριστη συμπαράστασή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ατέρμονη αγάπη τους και την ουσιαστική υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και ιδιαίτερα το σύζυγό μου Κωνσταντίνο που αποτελεί για εμένα πηγή δύναμης και πάντα με προτρέπει να προχωρώ μπροστά. Η υποστήριξή τους ήταν απαραίτητη για την ολοκλήρωση του έργου μου και πραγματικά τους ευχαριστώ.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1 Η ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΠΡΟΛΥΛ <i>CIS/TRANS</i> ΙΣΟΜΕΡΙΩΣΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1.1 Η ΙΣΟΜΕΡΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΟΛΥΛ <i>CIS/TRANS</i> ΙΣΟΜΕΡΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1.3 ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΛΥΛ <i>CIS/TRANS</i> ΙΣΟΜΕΡΙΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΡΡΙΑΣΕΣ.....</b>	<b>2</b>
<b>A.2 ΟΙ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΠΡΟΛΥΛ <i>CIS/TRANS</i> ΙΣΟΜΕΡΑΣΕΙΣ.....</b>	<b>3</b>
<b>A.2.1 ΟΙ FKBPΣ.....</b>	<b>3</b>
A.2.1.1 Οι ευκαρυωτικές FKBPΣ.....	4
A.2.1.1.1 Οι FKBPΣ του ανθρώπου.....	4
A.2.1.1.2 Οι FKBPΣ των φυτικών οργανισμών.....	4
A.2.1.1.3 Οι FKBPΣ λοιπών οργανισμών.....	6
A.2.1.2 Οι προκαρυωτικές FKBPΣ.....	6
<b>A.2.2 ΟΙ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΕΣ.....</b>	<b>10</b>
A.2.2.1 Οι ευκαρυωτικές παρβουλίνας.....	10
A.2.2.1.1 Οι παρβουλίνας του ανθρώπου.....	10
A.2.2.1.2 Οι παρβουλίνας των φυτικών οργανισμών.....	11
A.2.2.1.3 Οι παρβουλίνας λοιπών οργανισμών.....	12
<b>A.2.3 ΟΙ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΕΣ.....</b>	<b>13</b>
A.2.3.1 Η προκαρυωτική PpIC.....	13
A.2.3.1.1 Η δομή της PpIC.....	14
A.2.3.1.2 Η PpIC εμφανίζεται συντηρημένη.....	15
A.2.3.1.3 Ο ρόλος της PpIC στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών.....	15
A.2.3.2 Η προκαρυωτική SurA.....	16
A.2.3.2.1 Η δομή της SurA.....	17
A.2.3.2.2 Η SurA εμφανίζεται συντηρημένη.....	18
A.2.3.2.3 Ο ρόλος της SurA στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών.....	19
A.2.3.3 Η προκαρυωτική PpID.....	21
A.2.3.3.1 Η δομή της PpID.....	22
A.2.3.3.2 Η PpID εμφανίζεται συντηρημένη.....	23
A.2.3.3.3 Ο ρόλος της PpID στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών.....	23
<b>A.2.4 ΟΙ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ.....</b>	<b>24</b>
A.2.4.1 Οι ευκαρυωτικές κυκλοφιλίνας.....	25
A.2.4.1.1 Οι κυκλοφιλίνας του ανθρώπου.....	25
A.2.4.1.2 Οι κυκλοφιλίνας των φυτικών οργανισμών.....	26
A.2.4.1.3 Οι κυκλοφιλίνας λοιπών οργανισμών.....	27
<b>A.2.5 ΟΙ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ.....</b>	<b>28</b>
A.2.5.1 Η προκαρυωτική PpIA.....	28
A.2.5.1.1 Η δομή της PpIA.....	29
A.2.5.1.2 Ο ρόλος της PpIA στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών.....	30
A.2.5.2 Η προκαρυωτική PpIB.....	30
A.2.5.2.1 Η δομή της PpIB.....	31
A.2.5.2.2 Ο ρόλος της PpIB στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών.....	32
<b>A.3 Η ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....</b>	<b>32</b>

<b>A.3.1 ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ</b> .....	<b>32</b>
A.3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης .....	33
A.3.1.2 Διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την ομαδική κίνηση .....	35
A.3.1.1 Βιοσύνθεση και συναρμολόγηση των μαστιγίων .....	36
A.3.1.3 Έκκριση επιφανειοδραστικών ουσιών .....	38
A.3.1.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την απόφαση της κίνησης .....	40
A.3.1.5 Γονίδια που εμπλέκονται στην ομαδική κίνηση .....	42
<b>A.3.2 ΒΙΟΪΜΕΝΙΟ</b> .....	<b>44</b>
A.3.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του σχηματισμού βιοϊμενίου .....	44
A.3.2.2 Στάδια ανάπτυξης .....	45
A.3.2.3 Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϊμενίου .....	49
A.3.2.3.1 Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϊμενίου του βακτηρίου <i>E. coli</i> .....	49
A.3.2.5 Ο ρόλος των πεπτιδύλ-προλύλ <i>cis/trans</i> ισομερασών στην ομαδική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϊμενίου .....	52
<b>A.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ</b> .....	<b>53</b>
<b>A.4.1 Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ <i>E. COLI</i></b> .....	<b>53</b>
A.4.1.1 Ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου .....	54
A.4.1.2 Ρύθμιση της θέσης της κυτταρικής διαίρεσης και του σχηματισμού του του Z-δακτυλίου .....	56
A.4.1.3 Σύνδεση του διαφραγματικού δακτυλίου και του αποχωρισμού των χρωμοσωμάτων .....	58
A.4.1.4 Η σύσφιξη της μεμβράνης και η εξέλιξη του διαφράγματος .....	58
A.4.1.5 Η σύνθεση του πλευρικού τοιχώματος .....	59
<b>A.5 Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>ESCHERICHIA COLI</i></b> .....	<b>60</b>
<b>A.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	<b>62</b>
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>65</b>
<b>B.1 <i>IN SILICO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ</b> .....	<b>65</b>
<b>B.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ</b> .....	<b>65</b>
<b>B.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ</b> .....	<b>65</b>
B.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ GRAM (-) ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	65
B.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	66
B.3.2.1 Ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR .....	66
B.3.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	70
B.3.4 ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	71
B.3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ .....	72
B.3.6 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ .....	72
B.3.7 ΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ DNA ΛΙΓΑΣΗΣ .....	73
<b>B.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....	<b>73</b>
B.4.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. COLI</i> ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕΣΩ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ .....	73
B.4.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. COLI</i> ΜΕΣΩ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ .....	74
B.4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA .....	74
B.4.4 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΜΕΓΑΛΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ .....	75
<b>B.5 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ</b> .....	<b>75</b>
B.5.1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	75
B.5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ .....	76
B.5.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΑΠΙΔΥΣΗΣ .....	77



<b>B.5.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΪΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS).....</b>	<b>77</b>
<b>B.5.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD .....</b>	<b>79</b>
<b>B.5.6 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΡΡΙΒ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΔΙΑΤΕΤΑΓΜΕΝΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ.....</b>	<b>79</b>
<b>B.5.7 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN .....</b>	<b>80</b>
<b>B.5.8 OVERLAY ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (FAR-WESTERN BLOT) .....</b>	<b>81</b>
<b>B.5.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ .....</b>	<b>81</b>
<b>B.5.10 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ .....</b>	<b>82</b>
<b>B.5.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΣΑΠΕΡΟΝΗΣ.....</b>	<b>82</b>
<b>B.5.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΑΤΡΑΣΗΣ .....</b>	<b>83</b>
<b>B.5.13 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΜΕΤΑΦΟΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΡΤΑ .....</b>	<b>83</b>
<b>B.5.14 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΓΤΡΑΣΗΣ ΤΗΣ FTSZ.....</b>	<b>84</b>
<b>B.6 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΡΡΙΒ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΡΒΟΕΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΑΚΕΤΥΛΟ- COA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SPLIT-GFP.....</b>	<b>84</b>
<b>B.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ.....</b>	<b>86</b>
<b>B.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ.....</b>	<b>86</b>
<b>B.9 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ .....</b>	<b>87</b>
<b>B.10 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ.....</b>	<b>88</b>
<b>B.11 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ GFP ΕΠΙΤΟΠΟ ΚΑΙ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΝΤΙΘΕΣΗΣ ΦΑΣΗΣ (PHASE CONTRAST).....</b>	<b>88</b>
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>91</b>
<b>Γ.1 ΟΙ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΕΣ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>91</b>
<b>Γ.1.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ.....</b>	<b>91</b>
<b>Γ.1.2 ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ.....</b>	<b>92</b>
<i>Γ.1.2.1</i> Ικανότητα ομαδικής κίνησης ( <i>swarming</i> ) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών.....	93
<i>Γ.1.2.2</i> Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης ( <i>swimming</i> ) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών.....	94
<i>Γ.1.2.3</i> Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου ( <i>biofilm</i> ) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών.....	96
<i>Γ.1.2.4</i> Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση .....	97
<b>Γ.1.3 Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΣΑΠΕΡΟΝΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>98</b>
<i>Γ.1.3.1</i> Κατασκευή κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο ΡΡίασης των παρβουλινών.....	98
<i>Γ.1.3.2</i> Η παρβουλίνη SurA.....	99
<i>Γ.1.3.2.1</i> Ενζυμική ενεργότητα της SurA.....	99
<i>Γ.1.3.3</i> Η παρβουλίνη PpiC .....	99
<i>Γ.1.3.3.1</i> Ενζυμική ενεργότητα της PpiC .....	99
<i>Γ.1.3.3.2</i> Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους Δ <i>ppiC</i> στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια <i>ppiC</i> και <i>ppiC<sub>C41A</sub></i> .....	101
<i>Γ.1.3.3.3</i> Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια <i>ppiC</i> και <i>ppiC<sub>C41A</sub></i> .....	104

Γ.1.3.3.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113( <i>pprC</i> ), BW25113( <i>pprC<sub>C41A</sub></i> ) και <i>ΔpprC(pprC)</i> , <i>ΔpprC(pprC<sub>C41A</sub>)</i> κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση .....	106
<b>Γ.1.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΠΡΟΛΥΛ ΙΣΟΜΕΡΑΣΕΣ .....</b>	<b>108</b>
<b>Γ.1.5 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>ΔSURA(PPIASES)</i>, <i>ΔPPIC(PPIASES)</i> <i>ΔPPID(PPIASES)</i> ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ.....</b>	<b>115</b>
<b>Γ.1.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΗΣ <i>SUR</i>A.....</b>	<b>119</b>
Γ.1.6.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>SurA</i> .....	119
Γ.1.6.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>SurA</i> με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους .....	119
<b>Γ.1.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΗΣ <i>PPID</i>.....</b>	<b>120</b>
Γ.1.7.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>PpiD</i> .....	120
Γ.1.7.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>PpiD</i> με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους .....	121
<b>Γ.1.8 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΗΣ <i>PPIC</i>.....</b>	<b>121</b>
Γ.1.8.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>PpiC</i> .....	121
Γ.1.8.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>PpiC</i> με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους .....	122
<b>Γ.1.9 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ <i>PPIC</i> ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΣΤΟ <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>123</b>
Γ.1.9.1 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και <i>ΔpprC</i> όταν υπερεκφράζονται σε αυτά οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση .....	124
Γ.1.9.2 Ο ρόλος της <i>PpiC</i> στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση.....	126
Γ.1.9.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>PpiC</i> με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση στο βακτήριο <i>E. coli</i> .....	129
<b>Γ.2 ΟΙ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ ΤΟΥ <i>E. COLI</i>.....</b>	<b>132</b>
<b>Γ.2.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ .....</b>	<b>132</b>
<b>Γ.2.2 ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ.....</b>	<b>133</b>
Γ.2.2.1 Ικανότητα ομαδικής κίνησης ( <i>swarming</i> ) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των κυκλοφιλινών.....	134
Γ.2.2.2 Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης ( <i>swimming</i> ) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των κυκλοφιλινών.....	135
Γ.2.2.3 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου ( <i>biofilm</i> ) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των κυκλοφιλινών.....	136
Γ.2.2.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας του στελέχους <i>ΔpprIB</i> κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση .....	137
<b>Γ.2.3 Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ <i>PPI</i>ΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΣΑΠΕΡΟΝΗΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>139</b>
Γ.2.3.1 Κατασκευή κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο <i>PPI</i> άσης των κυκλοφιλινών.....	139
Γ.2.3.2 Η κυκλοφιλίνη <i>PpiA</i> .....	139
Γ.2.3.2.1 Ενζυμική ενεργότητα της <i>PpiA</i> .....	139
Γ.2.3.2.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>ΔpprIA</i> στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια <i>pprIA</i> , <i>pprIA<sub>F128A</sub></i> .....	141
Γ.2.3.2.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια <i>pprIA</i> και <i>pprIA<sub>F128A</sub></i> .....	142
Γ.2.3.2.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων κλώνων του γονιδίου <i>pprIA</i> στο βακτήριο <i>E. coli</i> .....	143
Γ.2.3.3 Η κυκλοφιλίνη <i>PpiB</i> .....	144
Γ.2.3.3.1 Ενζυμική ενεργότητα της <i>PpiB</i> .....	144
Γ.2.3.3.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>ΔpprIB</i> στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια <i>pprIB</i> , <i>pprIB<sub>F99A</sub></i> και <i>pprIB<sub>R43A</sub></i> .....	146
Γ.2.3.3.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια <i>pprIB</i> , <i>pprIB<sub>F99A</sub></i> και <i>pprIB<sub>R43A</sub></i> .....	148

Γ.2.3.3.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113( <i>ppiB</i> ), BW25113( <i>ppiB<sub>F99A</sub></i> ), BW25113( <i>ppiB<sub>R43A</sub></i> ), <i>ΔppiB</i> ( <i>ppiB</i> ), <i>ΔppiB</i> ( <i>ppiB<sub>F99A</sub></i> ) και <i>ΔppiB</i> ( <i>ppiB<sub>R43A</sub></i> ) κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση	150
Γ.2.3.3.5 Βιοχημικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων κλώνων του γονιδίου <i>ppiB</i> στο βακτήριο <i>E. coli</i>	153
<b>Γ.2.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΠΡΟΛΥΛ ΙΣΟΜΕΡΑΣΕΣ</b>	<b>155</b>
<b>Γ.2.5 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>ΔppiB</i>(<i>PPIASES</i>) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ</b>	<b>160</b>
<b>Γ.2.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΗΣ <i>PPIB</i></b>	<b>161</b>
Γ.2.6.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>PpiB</i>	161
Γ.2.6.2 Η επίδραση των πρωτεϊνών στόχων της <i>PpiB</i> στην κινητικότητα και στο σχηματισμό βιοϋμενίου	163
Γ.2.6.3 Διερεύνηση της κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου των <i>Δ(preys)</i> στελεχών	165
Γ.2.6.4 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>PpiB</i> με κάποιες από τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους	167
Γ.2.6.4.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της <i>PpiB</i> με την καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA ( <i>AccC</i> ) με τη μέθοδο SPLIT-GFP	172
Γ.2.6.5 Στην πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων της <i>PpiB</i> με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, εμπλέκεται το ενεργό κέντρο <i>PPI</i> άσης της	173
Γ.2.6.6 Η <i>PpiB</i> προκαλεί αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας ορισμένων πρωτεϊνών στόχων της	175
Γ.2.6.7 Ο ρόλος της <i>PpiB</i> στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση της <i>DnaK</i> , <i>AccC</i> και της <i>Pta</i>	178
<b>Γ.2.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ <i>PPIB</i> ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΣΤΟ <i>E. COLI</i></b>	<b>180</b>
Γ.2.7.1 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και <i>ΔppiB</i> όταν υπερεκφράζονται σε αυτά οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση	181
Γ.2.7.2 Ο ρόλος της <i>PpiB</i> στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση	183
Γ.2.7.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>PpiB</i> με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση στο βακτήριο <i>E. coli</i>	187
Γ.2.7.4 Διερεύνηση της δράσης των πρωτεϊνών στόχων της <i>PpiB</i> στη μορφολογία των κυττάρων κατά την ομαδική κίνηση και την εκθετική φάση ανάπτυξης	193
Γ.2.7.5 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των <i>Δ(preys)</i> στελεχών	195
<b>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>199</b>
<b>Δ.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. COLI</i> ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ</b>	<b>199</b>
<b>Δ.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΙΟΫΜΕΝΙΟΥ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. COLI</i></b>	<b>201</b>
<b>Δ.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ <i>PPIASES</i></b>	<b>204</b>
<b>Δ.4 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>206</b>
<b>Δ 4.1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ <i>PpiC</i> ΚΑΙ <i>PpiB</i> ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΙΡΕΣΗ</b>	<b>207</b>
<b>Δ.5 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΚΛΩΝΩΝ ΤΩΝ <i>PPIB</i> ΚΑΙ <i>PPIA</i> ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>E. COLI</i></b>	<b>211</b>
<b>Δ.7 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΩΝ ΤΟΥ <i>E. COLI</i></b>	<b>213</b>
<b>E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>219</b>
<b>ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>253</b>



## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## A. Εισαγωγή

### A.1 Η πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομερίωση

#### A.1.1 Η ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης

Τα αμινοξέα, τα οποία αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Ο πεπτιδικός δεσμός που συνδέει παρακείμενα αμινοξικά κατάλοιπα μπορεί να υιοθετήσει δύο διαφορετικές ισομερείς διαμορφώσεις, την *cis* και την *trans*. Κατά κανόνα ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ των περισσότερων αμινοξέων υιοθετεί την *trans* διαμόρφωση αφού είναι ενεργειακά προτιμότερη, με τις πλευρικές ομάδες να τοποθετούνται αντίθετα ( $\omega = 180^\circ$ ) και οι στερεοχημικές απόψεις μεταξύ των μη συνδεδεμένων ατόμων να είναι μικρότερες (Wang and Heitman, 2005). Ωστόσο, η κυκλική πλευρική ομάδα της προλίνης επιτρέπει στον πεπτιδικό δεσμό που σχηματίζεται μεταξύ ενός αμινοξέος και της προλίνης (X-Pro) να είναι ενεργειακά σταθερός και στη *cis* διαμόρφωση αφού η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των δύο ισομερών *cis/trans* είναι μικρότερη.

Έτσι όταν δεν υπάρχουν δομικοί περιορισμοί, όπως στα μικρά πεπτίδια και στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, οι πεπτιδικοί δεσμοί που προηγούνται της προλίνης μπορούν να υιοθετούν και τις δύο διαμορφώσεις αφού είναι ισοενεργειακές. Στην περίπτωση αυτή, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα ισορροπημένο μίγμα της *cis* και της *trans* διαμόρφωσης του προλύλ-δεσμού (Grathwohl and Wüthrich, 1981). Σε πρωτεΐνες με γνωστή τριτοταγή δομή, η διαμόρφωση που υιοθετεί κάθε πεπτιδικός δεσμός συνήθως είναι σαφώς καθορισμένη. Περίπου το 7% του συνόλου των προλύλ-δεσμών σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες βρέθηκε ότι υιοθετεί τη *cis* διαμόρφωση, σε σύγκριση με το σύνολο των μη-προλύλ δεσμών όπου το ποσοστό είναι μικρότερο, 0,03% (Stewart et al., 1990; Macarthur and Thornton, 1991).

#### A.1.2 Ο ρόλος της προλύλ *cis/trans* ισομερίωσης στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Οι διάφορες βιολογικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε ένα κύτταρο αποτελούν δυναμικά γεγονότα, τα οποία ελέγχονται από δίκτυα αυστηρά ρυθμιζόμενων ενδοκυτταρικών αλληλεπιδράσεων και ενζυμικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν ένα συγκεκριμένο υποσύνολο πρωτεϊνών. Έτσι η σωστή ρύθμιση της πρωτεϊνικής λειτουργίας είναι καθοριστικής σημασίας για τις κυτταρικές λειτουργίες και συντελείται μέσω ρυθμιστικών μηχανισμών όπως είναι οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η αλλοστερική ρύθμιση και η ρυθμιζόμενη πρωτεϊνική αποδόμηση (Lu et al., 2007).

Οι πρωτεΐνες, ανεξαρτήτως του μεγέθους τους, πρέπει να αναδιπλωθούν έτσι ώστε να λάβουν μια τριτοταγή διαμόρφωση, προκειμένου να είναι βιολογικά ενεργές. 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 (Erstein et al., 1963). Τις τελευταίες δεκαετίες άρχισε να εκτιμάται η συνεισφορά των διαμορφωτικών αλλαγών των πρωτεϊνών στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών και πιο συγκεκριμένα η εγγενής διαμορφωτική αλλαγή που παρέχεται στα πεπτίδια μέσω της προλύλ *cis/trans* ισομερίωσης (Lu et al., 2007).

Η προλύλ *cis/trans* ισομερίωση λειτουργεί σαν μοριακός διακόπτης όπου το κύτταρο μπορεί να ελέγχει το εύρος και τη διάρκεια μιας κυτταρικής διαδικασίας μέσω μιας αλλαγής στην πρωτεϊνική στερεοδομή (Andreotti, 2003; Wulf et al., 2005). Η *de novo* αναδίπλωση πρωτεϊνών και η επαναδίπλωση πρωτεϊνών που έπεται της διαμεμβρανικής διακίνησης, είναι διαδικασίες που απαιτούν ισομερίωση προς τη *cis*

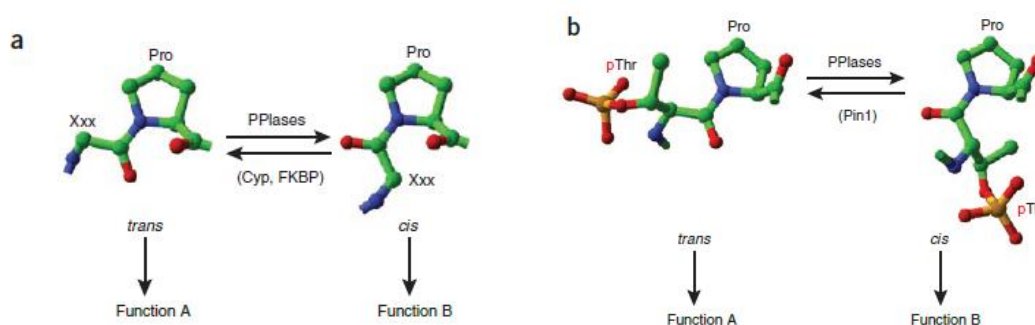
διαμόρφωση (Wang and Heitman, 2005). Τα μόρια με τη σωστή πρωτεϊνική διαμόρφωση του προλύλ-δεσμού μπορούν να αναδιπλωθούν στη φυσιολογική πρωτεϊνική δομή ενώ τα υπόλοιπα πρέπει να υποστούν προλύλ-ισομερίωση στα πλαίσια της επαναδίπλωσης, ώστε να επιτευχθεί η πλήρως αναδιπλωμένη κατάσταση (Jacob and Schmid, 2008). Η προλύλ *cis/trans* ισομερίωση θεωρείται σημαντική όχι μόνο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών αλλά και κατά τη συναρμολόγηση πρωτεϊνών που διαθέτουν πολλές δομικές περιοχές (Göthel and Marahiel, 1999). Ενώ αυθόρμητα η ισομερίωση είναι μια αργού ρυθμού αντίδραση, καταλύεται από ένζυμα, τις πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIases- Peptidyl-Prolyl Isomerases; EC: 5.2.1.8).

### A.1.3 Κατάλυση της προλύλ *cis/trans* ισομερίωσης από τις PPIάσες

Η αυθόρμητη ισομερίωση των πεπτιδύλ-προλύλ δεσμών απαιτεί ελεύθερη ενέργεια και είναι αργή αντίδραση με σταθερές χρόνου μεταξύ 10-100s (στους 25°C), επειδή συνεπάγεται την περιστροφή γύρω έναν μερικώς διπλό δεσμό (ενέργεια ενεργοποίησης 80-100 kJ / mol) (Schmid, 1993).

Σύμφωνα με τη θεμελιώδη αρχή της ενζυμικής κατάλυσης, ένα ένζυμο επιταχύνει μια συγκεκριμένη αντίδραση μειώνοντας το φράγμα ενεργοποίησης για την αντίδραση ή/και αυξάνοντας την ενέργεια του δεσμευμένου υποστρώματος (Fersht, 1999). Οι PPIάσες λειτουργούν ως παράγοντες επιτάχυνσης, επιταχύνοντας την *cis-trans* μετατροπή και αντίθετα, κατά αρκετές τάξεις μεγέθους (διαρκεί από ένα χιλιοστό του δευτερολέπτου έως ένα δευτερόλεπτο) (Fanghänel and Fischer, 2004; Schmid, 1993). Τα *cis* και *trans* ισομερή μπορούν το καθένα να δράσουν είτε ως υπόστρωμα είτε ως προϊόν χωρίς να είναι ακόμα γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους ( Fanghänel and Fischer, 2004; Lu et al., 2007).

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 (Göthel and Marahiel, 1999). Απουσία PPIασών, αν το *cis* ή *trans* ισομερές εξαντληθεί, η επαναφορά του ισοζυγίου των *cis* και *trans* ισομερών θα απαιτούσε πολλά λεπτά (Lu and Zhou, 2007). Μέσω της επιτάχυνσης της ισομερίωσης, οι PPIάσες μπορούν να ελέγχουν τη χρονική στιγμή που θα συμβεί ένα βιολογικό γεγονός όπως είναι εξειδικευμένες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ως προς κάποιο ισομερές (Lu et al., 2007).



**Εικόνα A.1.1.** Ο πεπτιδικός δεσμός προλίνης έχει τη δυνατότητα να διαθέτει και τις δύο ισομερείς διαμορφώσεις. Η ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού προλίνης είναι μια αργή διαδικασία και καταλύεται από ένζυμα με ενεργότητα PPIάσης (Lu et al., 2007).



## A.2 Οι πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομεράσες

Οι πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIάσες; EC: 5.2.1.8) αποτελούν μια υπεροικογένεια συντηρημένων κατά την εξέλιξη, πρωτεϊνών (Gothel and Marahiel, 1999). Τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών, ονομάζονται επίσης και ανοσοφιλίνες, διακρίνονται σε τρεις οικογένειες βάσει της δέσμευσης σε διαφορετικά υποστρώματα και όχι βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας τους η οποία δεν παρουσιάζεται συντηρημένη: τις κυκλοφιλίνες (Cyclophilins, Cyphs) οι οποίες δεσμεύουν την κυκλοσπορίνη A, τις FKBP's οι οποίες δεσμεύουν το FK506 και τις παρβουλίνες (Parvulins, Pars) οι οποίες δεσμεύουν την 5-υδροξύ-1,4-ναφθοκινόνη. Επιπλέον, έχει εντοπιστεί ενεργότητα PPIάσης και σε άλλες πρωτεΐνες όπως είναι ο ενεργοποιητής Ser/Thr φωσφατάσης 2A (Jordens et al., 2006) και οι μεταφραστικές GTPάσες (trGTPases) (Wang et al., 2012).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, η κυκλοσπορίνη A (CsA), ένα ενδεκαπεπτίδιο το οποίο προέρχεται από μύκητες όπως ο *Tolyrocladium inflatum*, χορηγούνταν ως ανοσοκατασταλτική αγωγή ενώ πλέον χρησιμοποιείται ευρέως με σκοπό την πρόληψη και τη θεραπεία της απόρριψης μοσχεύματος ανθρώπινων οργάνων και ιστών. Το 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 ήταν και PPIάσες.

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), το οποίο 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).

Επί μακρό χρονικό διάστημα ο αναστολέας της τρίτης ομάδας των PPIασών, 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.2.1 Οι FKBP's

Οι FKBP's (FK506-binding proteins), ανήκουν στις ανοσοφιλίνες και δεσμεύουν ανοσοκατασταλτικές ενώσεις, όπως το FK506 και τη ραπαμυκίνη (Gothel and Marahiel, 1999). Τα μέλη της FKBP οικογένειας, είναι πρωτεΐνες υψηλά συντηρημένες στο σύνολο τους, εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς, ευκαρυώτες ή προκαρυώτες και το μοριακό τους μέγεθος κυμαίνεται από 12kDa έως 135kDa. Η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας, η FKBP12, απομονώθηκε το 1989 (Harding et al., 1989; Siekierka et al., 1989) και διαθέτει μία περιοχή δέσμευσης του FK506 (FKBD περιοχή), η οποία αποτελεί και το ενεργό κέντρο κατάλυσης της *cis/trans* ισομερίωσης. Η FKBD περιοχή αποτελεί μια συντηρημένη αλληλουχία 110 αμινοξέων, χαρακτηριστική των μελών της οικογένειας (Galat, 2003).

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 ΡΡΐάσης (Kamphausen et al., 2002; Sinars et al., 2003; Lima et al., 2006) ενώ παράλληλα παρουσιάζουν ενεργότητα τσαπερόνης. Στις περισσότερες των περιπτώσεων η ενζυμική ενεργότητα ΡΡΐάσης και η ενεργότητα τσαπερόνης είναι δύο ανεξάρτητες ενεργότητες που εδράζονται σε διαφορετικές δομικές περιοχές του ενζύμου.

Οι FKBP's μέσω αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς στεροειδών ορμονών, κινασών ή άλλων κυτταρικών παραγόντων εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες αλλά και παθολογικές καταστάσεις στα θηλαστικά όπως είναι ο κυτταρικός κύκλος, η μεταγωγή σήματος, η απόπτωση και η εμπλοκή τους στον καρκίνο.

### **A.2.1.1 Οι ευκαρυωτικές FKBP's**

#### **A.2.1.1.1 Οι FKBP's του ανθρώπου**

Στον άνθρωπο προς το παρόν, έχουν εντοπιστεί δεκαοχτώ FKBP's (Thapar R., 2015). Όπως αναφέρθηκε η FKBP12 είναι η πρώτη FKBP πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε σε ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα. Η FKBP12 (επίσης γνωστή ως FKBP1A) είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, αποτελείται από 108 αμινοξέα, περιέχει έναν μόνο FKBP τομέα, ορίζεται κυρίως ως υποδοχέας για το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο FK506 και εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς (Aghdasi et al., 2001). Η FKBP12 συνδέεται με τον υποδοχέα TGFβ (Ser-Thr Kinase receptor) και σταθεροποιεί την ανενεργή του διαμόρφωση, ενώ όταν αποσυνδέεται από αυτόν ενισχύεται η TGFβ μεταγωγή σήματος για την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Stockwell and Schreiber, 1998). Επίσης, διαμορφώνει τους διαύλους  $Ca^{2+}$  και συγκεκριμένα σταθεροποιεί τη διαμόρφωση του υποδοχέα IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) και του υποδοχέα της ρυανοδίνης (Kang et al., 2008). Απενεργοποίηση του *FKBP12* γονιδίου σε ποντίκια οδηγεί σε θάνατο λόγω καρδιακής υπερτροφίας και μη φυσιολογικής λειτουργίας των καναλιών  $Ca^{2+}$  (Shou et al., 1998). Η δευτεροταγής δομή της FKBP12 αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές και από μια α-έλικα (Schmid, 1993).

Η FKBP13 εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και θεωρείται ότι δρα ως συνοδός πρωτεΐνη αφού η έκφραση του γονιδίου *hFKBP13* επάγεται από την παρουσία μη-διπλωμένων πρωτεϊνών π.χ. μετά από θερμικό σοκ (Nigam et al., 1993). Η FKBP25, εδράζεται στον πυρήνα όπου ρυθμίζει την YY1 μεταγραφική δραστηριότητα και αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στην ωρίμανση του ριβοσώματος (Gudavicius et al., 2014). Η FKBP38 διαθέτει μια ανενεργή FKBP περιοχή ενώ συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης (Kang et al., 2008).

Οι FKBP51 και FKBP52 ήταν οι πρώτες ανοσοφιλίνες που χαρακτηρίστηκαν ως μέλη του συμπλόκου των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (Smith et al., 1993). Αυτές οι FKBP's μαζί με την Hsp90 και τη συνοδό πρωτεΐνη p23, ελέγχουν τη δραστηριότητα όλων των μεγάλων υποδοχέων στεροειδών "τύπου I": του υποδοχέα ανδρογόνων (AR), του υποδοχέα οιστρογόνου (ER), του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και του υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (MR) (Sanchez, 2012).

#### **A.2.1.1.2 Οι FKBP's των φυτικών οργανισμών**

Οι FKBP's αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών και στα ανώτερα φυτά απαντώνται σε αφθονία. Στο *Arabidopsis thaliana*, τουλάχιστον 23 γονίδια κωδικοποιούν FKBP's ενώ στο *Oryza sativa*, έχουν ταυτοποιηθεί 29 γονίδια. Αρκετά από αυτά τα γονίδια είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση της

ανάπτυξης των φυτών. Μερικά από τα κυτταρικά διαμερίσματα στα οποία εντοπίζονται οι FKBP's είναι το κυτταρόπλασμα, ο πυρήνας και οι χλωροπλάστες (Gollan et al., 2012). Παραδόξως, ο χλωροπλάστης φιλοξενεί το μεγαλύτερο αριθμό των FKBP's. Οι περισσότερες από αυτές είναι εντοπισμένες στον αυλό των θυλακοειδών και εμπλέκονται στη συγκρότηση του φωτοσυνθετικού πρωτεϊνικού συμπλόκου και στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση (Romano et al., 2004).

Στο *Arabidopsis* από τα 23 μέλη της FKBP οικογένειας, τα δώδεκα μέλη εντοπίζονται στο στρώμα του χλωροπλάστη, δύο μέλη προβλέπεται να συμμετέχουν σε εκκριτικές οδούς (AtFKBP15-1, 15-2), πέντε εντοπίζονται στον πυρήνα και τα υπόλοιπα τέσσερα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (He et al., 2004).

Σημαντικό ρόλο στην οργάνωση των φωτοσυνθετικών μεμβρανών διαδραματίζει η AtFKBP20-2 που απαντάται στον αυλό των θυλακοειδών και εμπλέκεται στη ρύθμιση της συναρμολόγησης του φωτοσυστήματος II (Lima et al., 2006). Η AtFKBP16-1 εντοπίζεται στο στρώμα του χλωροπλάστη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόωμη ανάπτυξη των χλωροπλάστων, την αρχιτεκτονική της φωτοσυνθετικής συσκευής και την ανάπτυξη των φυτών (Gollan and Bhawe, 2010). Ενώ, η AtFKBP16-2 αλληλεπιδρά με ένα υπο-σύμπλοκο του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης NADPH (NDH), σταθεροποιώντας έτσι την αλληλεπίδραση μεταξύ NDH και φωτοσυστήματος I (PSI) (Peng et al., 2009).

Στην αναπτύξη των φυτών σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η πρωτεΐνη AtFKBP42 και η πρωτεΐνη AtFKBP72. Η AtFKBP42 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, αποτελείται από 365 κατάλοιπα αμινοξέων και είναι επίσης γνωστή ως TWISTED DWARF1 (TWD1) καθώς φυτά που φέρουν απαλοιφή του γονιδίου παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη και ελικοειδείς ρίζες και βλαστούς (Kamphausen et al., 2002). Ο φαινότυπος αυτός οφείλεται στη διακοπτόμενη μεταφορά αυξίνης αφού η μοναδική FKBD περιοχή της AtFKBP42 αλληλεπιδρά με τους AtPGP1 και AtPGP19, οι οποίοι είναι ABC μεταφορείς που ρυθμίζουν το σχηματισμό του μηχανισμού μεταφοράς αυξίνης στην πλασματική μεμβράνη (Geisler et al., 2003). Η AtFKBP72, επίσης γνωστή ως PASTICCINO1 (PAS1), εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού. Μεταλλάξεις στην C-τελική περιοχή της AtFKBP72 προκαλούν σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης (Vittorioso et al., 1998). Επίσης, η AtFKBP72 αλληλεπιδρά με έναν μεταγραφικό παράγοντα τύπου NAC και έχει προταθεί ότι ρυθμίζει τη λειτουργία του, ελέγχοντας τη μεταφορά του στο πυρηνικό διαμέρισμα φυτικών κυττάρων που διαιρούνται (Smyczynski et al., 2006).

Η AtFKBP12, που αποτελεί το μικρότερο μέλος της οικογένειας στο *Arabidopsis*, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά ειδικά με την AtFIP37. Η AtFIP37 πιστεύεται ότι είναι ένας παράγοντας ματίσματος του mRNA και λειτουργεί κυρίως στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης και του σχηματισμού του ενδοσπερμίου (Vespa et al., 2004). Η ομόλογη της από το κωνοφόρο, *Picea wilsonii* (PwFKBP12) έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την υπομονάδα ενός μεταγραφικού παράγοντα που συνδέεται με τις ιστόνες, την HAP5 (Yu et al., 2011). Επίσης, η AtFKBP53 εμπλέκεται στον μηχανισμό ρύθμισης έκφρασης γονιδίων, εντοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με την ιστόνη H3 ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή των γονιδίων του 18S rRNA (Li and Luan, 2010).

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 AtFKBP62 προσδένεται μέσω της TPR περιοχή της στην HSP90 και μαζί προσδένονται στον HsfA2 μεταγραφικό παράγοντα, όπου σαν σύμπλοκο μεταφέρονται 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 προσδένεται στην FKBD περιοχή της AtFKBP62, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των sHSPs (Meiri et al., 2010). 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). Τέλος, η υπερέκφραση της *AtFKBP65* οδηγεί σε αυξημένη συσσώρευση καλλόζης στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική αντίσταση του φυτού κατά των παθογόνων (Pogorelko et al., 2014).

#### A.2.1.1.3 Οι FKBP's λοιπών οργανισμών

Στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχουν εντοπιστεί τέσσερις πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των FKBP's. Η *ScFpr1* (12kDa) είναι κυτταροπλασματική και διαθέτει έναν τομέα FKBD. Η *ScFpr2* (12.5kDa) εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι θερμοεπαγόμενη (Dolinski and Heitman, 1999). Οι *ScFpr3* (70kDa) και *ScFpr4* (60kDa) εδράζονται στον πυρηνίσκο και είναι ομόλογες (Göthel and Marahiel, 1999). Έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με την H3 ιστόνη και αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί την ισομερίωση των καταλοίπων προλίνης της H3 με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεθυλίωσής της (Nelson et al., 2006). Η *ScFpr4* έχει δείχθει ότι δεσμεύει τις ιστόνες H3 και H4 μέσω του N-τελικού τομέα νουκλεολίνης και αναγνωρίζει μια σύντομη ακολουθία 8 αμινοξέων ανοδικά των τριών προλινών στην ουρά της ιστόνης H3 (P16, P30, P38) και μία προλίνη στην ουρά της ιστόνης H4 (P32). 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.2.1.2 Οι προκαρυωτικές FKBP's

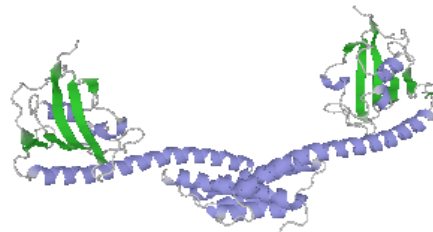
Οι πρωτεΐνες MIP (*macrophage infectivity potentiator proteins*), οι οποίες εμφανίζουν ενεργότητα PPIάσης, ανήκουν στην οικογένεια των FKBP's και εκκρίνονται από έναν υψηλό αριθμό παθογόνων βακτηρίων και έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες παθογένειας. Οι πρωτεΐνες MIP αρχικά περιγράφηκαν στον μικροοργανισμό *L. pneumophila* (Gaestel, 2006).

Οι προκαρυωτικές FKBP's παρουσιάζουν ενεργότητα PPIάσης και ενεργότητα τσαπερόνης. Στο βακτήριο *E. coli* απαντώνται οι εξής πέντε: η FkpA (28.8kDa), η FkpB (16kDa), η FklB (22kDa), η SlyD (20kDa) και η TF (48kDa).

Η FkpA περιγράφηκε αρχικά το 1995 ως ένα νέο μέλος της FKBP οικογένειας λόγω της αλληλουχικής ομολογίας (83%) που παρουσιάζει το καρβόξυ-τελικό άκρο της με την περιοχή σύνδεσης του FK506 και εντοπίζεται στο περίπλασμα (Horne and Young, 1995). Η FkpA είναι ένα ομοδιμερές σχήματος V που αποτελείται από δύο υπομονάδες περιέχει 245 αμινοξέα. Κάθε μονομερές μπορεί να χωριστεί σε δύο δομικές περιοχές, μια N-τελική περιοχή που αποτελείται από τρεις έλικες υπεύθυνη για την ενεργότητα τσαπερόνης και μια C-τελική περιοχή υπεύθυνη για τη ενεργότητα PPIάσης. Οι έλικες της N-τελικής περιοχής είναι συνυφασμένες με αυτές της άλλης υπομονάδας και επιτρέπουν το διμερισμό της πρωτεΐνης (Rosen et al., 1990; Saul et al., 2004). Η ενεργότητα τσαπερόνης και η ενεργότητα PPIάσης αποτελούν δύο ανεξάρτητες και διαφορετικές ιδιότητες οι οποίες πραγματοποιούνται από τις δύο διαφορετικές δομικές περιοχές (Saul et al., 2004).

Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της FkpA αποτρέπει *in vivo* και *in vitro* τη συσσωμάτωση της μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης πρόσδεσης της μαλτόζης (*maltose-binding protein-MBP*) MalE (Arie et al., 2001) και διαθέτει τη δυνατότητα αναδίπλωσης των απλών αλυσίδων μεταβλητής περιοχής (*single chain Fv-scFv*) των αντισωμάτων (Bothmann and Pluckthun, 2000). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η FkpA μαζί με την Skp εμπλέκονται στην αναδίπλωση των LptD και FhuA, δυο OMP που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό για την αναδίπλωσή τους από την SurA (Schwalm et al., 2013). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι Skp και

FkpA δεν είναι σε θέση να επαναφέρουν τη μη σωστή αναδίπλωση των LptD και FhuA που παρατηρείται σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος SurA, γεγονός που υποδηλώνει ότι εκτελούν διακριτούς ρόλους σε αυτήν τη διαδικασία (Schwalm et al., 2013). Η τριτοταγής δομή της FkpA απεικονίζεται στην Εικόνα A.2.1.



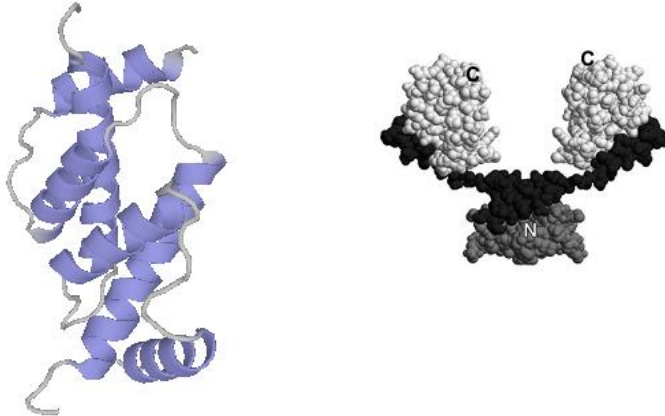
**Εικόνα A.2.1.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης FkpA του *E. coli*. Διακρίνονται ανά μονομερές, οι β-πτυχωτές επιφάνειες με πράσινο χρώμα (FKBP περιοχή) και οι α-έλικες με μοβ (περιοχή ενεργότητας τσαπερόνης) (PDB ID: 1Q6U) (Saul et al., 2004).

Η FkpB (ή SfpA) είναι ίσως η λιγότερο μελετημένη πρωτεΐνη της FKBP οικογένειας. Ανήκει στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ORF149, ανάμεσα από τα γονίδια *lspA* και *ispH* (Isaki et al., 1990). Αποτελείται από 149 αμινοξέα, έχει μέγεθος 16 kDa και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του *E. coli*. Η μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη FkpB ρυθμίζεται από τον παράγοντα  $\sigma^{32}$  (Novaka et al., 2006). Ενώ η ενεργότητα PPIάσης της FkpB έχει προσδιοριστεί με τις μεθόδους της χυμοθρυψίνης και της τρυψίνης, όπου η σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilide (φαινυλαλανίνη) ανέρχεται στα  $7.400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  και έναντι του Suc-Ala-Phe-Pro-Arg-4-NA ανέρχεται στα  $6.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  αντίστοιχα (Hottenrott et al., 1997). Επίσης, παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα τσαπερόνης, με την ενεργότητα PPIάσης (FKBP περιοχή) και την ενεργότητα τσαπερόνης (IF περιοχή, insert-in-flap) να 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. Η τριτοταγής δομή της *EcfkpB* απεικονίζεται στην Εικόνα A.2.2.



**Εικόνα A.2.2.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης FkpB του *E. coli*. Διακρίνονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες με πράσινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ (PDB ID: 4DT4)(Quistgaard et al., 2012).

Η FklB απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε αρχικά από τους Rahfeld et al. το 1996 και το μοριακό της βάρος είναι 22 kDa (Rahfeld et al., 1996). Η FklB παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης καθώς η σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilide (λευκίνη) υπολογίστηκε στα  $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (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 FklB είναι ομοδιμερές μόριο, έχει τη μορφή V (V shaped) και αποτελείται από δύο δομικές περιοχές ανά μονομερές (Budiman et al., 2011). Η τριτοταγής δομή της FklB απεικονίζεται στην Εικόνα A.2.3.

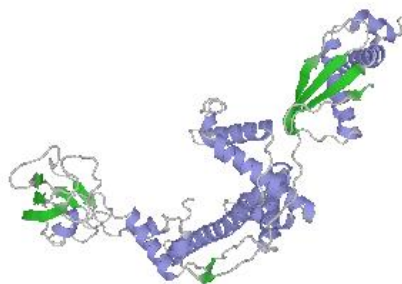


**Εικόνα A.2.3.** Η τριτοταγής δομή της διμερούς πρωτεΐνης FKBP22 του *Shewanella* sp. SIB1. Διακρίνονται ανά μονομερές οι  $\alpha$ -έλικες (PDB ID: 3B09) (Saul et al., 2003; Suzuki et al., 2004).

Η SlyD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και ανακαλύφθηκε ως ένας παράγοντας του ξενιστή που απαιτείται κατά το λυτικό κύκλο του βακτηριοφάγου  $\phi$ X174, γεγονός στο οποίο οφείλεται η ονομασία της (Sensitive to lysis D), ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση ικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα της υδρόφοβης πρωτεΐνης E (Roof et al., 1994; Bernhardt et al., 2002). Την ίδια περίπου στιγμή, η SlyD αναγνωρίστηκε ως επίμονος μολυσματικός παράγοντας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά την απομόνωσή τους με χρωματογραφία συγγένειας (Wulfing et al., 1994). Το καρβόξυ-τελικό της άκρο περιέχει πολλά υπολείμματα κυστεΐνης και ιστιδίνης, και ως εκ τούτου, συνδέεται ισχυρά με δισθενή κατιόντα όπως  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ή  $\text{Zn}^{2+}$  (Wulfing et al., 1994).

Αποτελείται από δύο δομικές περιοχές, μία FKBP περιοχή όπου εδράζεται η ενεργότητα PPIάσης και μία περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος που φέρει ενεργότητα τσαπερόνης (IF περιοχή, insert-in-flap). Η SlyD εμφανίζει υψηλότερη ενεργότητα PPIάσης από την ομόλογη hFKBP12, με σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Phe-Pro-Arg-4-nitroanilide έχει υπολογιστεί στα  $29600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (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). Τόσο η FKBP περιοχή όσο και η IF περιοχή, απαιτούνται για την κατάλυση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Η IF περιοχή είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων αφού εκτομή της από την SlyD είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας αναδίπλωσης πρωτεϊνών κατά 100 φορές (Knapp et al., 2007). Η συνεργιστική δράση των δύο περιοχών μετατρέπουν την SlyD σε μια πρωτεΐνη με μεγαλύτερη ενεργότητα PPIάσης (Weininger et al., 2009b).

Το πέμπτο και τελευταίο μέλος της οικογένειας FKBP είναι η αναδιπλάση trigger factor (TF), η οποία αρχικά ανακαλύφθηκε από τους Crooke και Wickner, ως μια κυτταροπλασματική 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). Οχτώ χρόνια αργότερα οι Stoller et al. προσδιόρισαν την TF ως μια PPIάση που προσδέεται στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος και διαθέτει ενεργότητα PPIάσης με τη σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-NH-Np να ανέρχεται στα  $0.43 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Stoller et al., 1995), ενώ αναγνωρίζει και νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια στόχους, τα οποία δε φέρουν κατάλοιπα προλίνης (Scholz et al., 1998). Η TF είναι ένα εκτεταμένο μόριο που αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές. Η αμινο-τελική περιοχή (κατάλοιπα αμινοξέων 1-110) δεσμεύεται στην πρωτεΐνη L23 στην περιοχή εξόδου των πεπτιδίων του ριβοσώματος (Kramer et al., 2002) και του 23S rRNA (Ferbitz et al., 2004). Τα τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας 111-149 και 246-432, μαζί σχηματίζουν την περιοχή τσαπερόνης. Ενώ η τρίτη περιοχή (145-247 κατάλοιπα αμινοξέων) παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης (FKBP περιοχή). Το ελάχιστο μήκος της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας που αλληλεπιδρά με την *tig* αποτελείται από 57 κατάλοιπα αμινοξέων. Η απελευθέρωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από την *Ectig* δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την υδρόλυση του ATP (Hoffmann et al., 2010). Επίσης, σχετίζεται και με την αντίσταση των μικροοργανισμών σε συνθήκες καταπόνησης, καθώς βρέθηκε ότι τα μειωμένα επίπεδά της προκαλούν μειωμένη βιωσιμότητα στο *E.coli*, σε χαμηλές θερμοκρασίες (Kandror and Goldberg, 1997). Η τριτοταγής δομή της TF απεικονίζεται στην Εικόνα A.2.4.



**Εικόνα A.2.4.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης TF του *E. coli*. Διακρίνονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες με πράσινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ (PDB ID: 1W26) (Ferbitz et al., 2004).

## A.2.2 Οι παρβουλίνες

Οι παρβουλίνες αποτελούν τη μικρότερη οικογένεια των ΡΡΙΑσών. Το πρώτο μέλος της οικογένειας ανακαλύφθηκε στο βακτήριο *E. coli* από τον Rahfeld (Rahfeld et al., 1994). Αυτό το ένζυμο αποτελούνταν μόλις από 92 αμινοξέα, και ως εκ τούτου, ονομάστηκε parvulin (από τη λατινική λέξη parvulus: «πολύ μικρή» ή «ο μικρός»). Οι παρβουλίνες δεν εμφανίζουν ομολογία με τις κυκλοφιλίνες και τις FKBP's και δεν έχουν τη δυνατότητα δέσμευσης της CsA ή του FK506. Για μεγάλο χρονικό διάστημα δεν υπήρχε γνωστός αναστολέας για την οικογένεια, αλλά αργότερα βρέθηκε ότι η χημική ουσία γιουγλόνη (juglone) μπορεί να αναστέλλει μη αντιστρεπτά την ενζυμική δραστηριότητα της Par10, ενώ άφηνε ανεπηρέαστες τις υπόλοιπες ΡΡΙΑσες του βακτηρίου *E. coli* (Hennig et al., 1998). Μέσω της ευθυγράμμισης της αλληλουχίας της προέκυψε ότι η νέα ΡΡΙΑση εμφάνιζε ομολογία με μεγαλύτερες πρωτεΐνες βακτηρίων, ζυμών, σπονδυλωτών ακόμα και του ανθρώπου (Rahfeld et al., 1994). Μια από τις πιο γνωστές παρβουλίνες είναι η ανθρώπινη Pin1. Οι διαφορές στην εξειδίκευση του υποστρώματος ανάμεσα στην ανθρώπινη Pin1 και την Par10 του *E. coli* επισημαίνουν ότι στην οικογένεια των παρβουλινών υπάρχουν δύο υποοικογένειες. Οι παρβουλίνες τύπου PIN, παρουσιάζουν ενζυμική εξειδίκευση έναντι πρωτεϊνών οι οποίες περιλαμβάνουν στην ακολουθία τους φωσφορυλιωμένη σερίνη ή θρεονίνη πριν από την προλίνη (pSer/Thr-Pro) και η ενζυμική τους δραστηριότητα είναι εξαιρετικά υψηλή, αφού οι παρατηρούμενες τιμές του λόγου  $k_{cat} / K_m$  μεταξύ των παρβουλινών αυτών ποικίλει σε μία κλίμακα από  $10^3$ - $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Επίσης, οι παρβουλίνες τύπου PIN, μέσω ευθυγράμμισης των αλληλουχιών τους, προέκυψε ότι έχουν ταυτόσημο σύνολο αμινοξέων στα ενεργό τους κέντρο. Από την άλλη πλευρά, οι παρβουλίνες τύπου Par10 του *E. coli*, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλουχική μεταβλητότητα (Fanghänel and Fischer, 2004).

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.2.2.1 Οι ευκαρυωτικές παρβουλίνες

#### A.2.2.1.1 Οι παρβουλίνες του ανθρώπου

Στον άνθρωπο, έχουν εντοπιστεί οι εξής τρεις παρβουλίνες: η Pin1, η Par14 και η Par17.

Η Pin1 (Protein Interacting with NIMA) αποτελεί την πιο καλά μελετημένη παρβουλίνη του ανθρώπου, εντοπίστηκε το 1996, ως η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την κινάση NIMA (NEVER In Mitosis A) από τον *Aspergillus nidulans* (Lu et al., 1996) και καταλύει την αναδίπλωση πρωτεϊνών *in vitro* (Scholz et al., 1997a). Ανήκει στις παρβουλίνες τύπου PIN, αφού 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, τη λειτουργικότητα και την υποκυτταρική τοποθέτηση των φωσφοπρωτεϊνών ενώ η ιδιότητά της αυτή αποτέλεσε καίριο σημείο έρευνας. Η Pin1 αποτελείται από 163 αμινοξέα και απαρτίζεται από δύο δομικές περιοχές, μια WW περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του μοτίβου pSer/Thr-Pro των πρωτεϊνών και μια καταλυτική περιοχή ΡΡΙΑσης που εδράζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (Ranganathan et al., 1997).

Οι λειτουργίες της Pin1 ελέγχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς και σε πολλαπλά επίπεδα από μεταγραφικό έως μετά-μεταγραφικό. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης της εξαρτώνται άμεσα από τη δυναμική



πολλαπλασιασμού των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες ενώ αυξάνονται περεταίρω σε πολλούς τύπους καρκίνων (Ryo et al., 2001; Wulf et al., 2001). Η καταστολή του γονιδίου *hpin1* είναι ικανή να παρεμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Bao et al., 2004). Η Pin1 συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων, όσο και κάτω από παθολογικές συνθήκες όπως είναι η ανοσοαπόκριση και η απόπτωση (ενεργοποίηση του p53 μεταγραφικού ενεργοποιητή). Επίσης, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες των κυττάρων αυτών όπως είναι η πρωτεΐνη tau του κυτταροσκελετού (Hamdane et al., 2006). Έτσι, εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις του νευρικού συστήματος όπως είναι οι ασθένειες Alzheimer και Parkinson (Ryo et al., 2006; Lu et al., 1999b). Ακόμα, έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και ρυθμίζει την πορεία των γεγονότων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης (Lin et al., 2015).

Η Par14 αποτελείται από 131 αμινοξέα και εκτός από την καρβόξυ-τελική περιοχή ΡΡΪάσης φέρει και στο άμινο-τελικό της άκρο μια εύκαμπτη προέκταση μήκους 35 αμινοξέων, η οποία δεν παρουσιάζει αλληλουχική ομολογία με τη δομική περιοχή WW της Pin1 (Terada et al., 2001). Η φωσφορυλίωση στην περιοχή του αμινοξέος Ser-19 ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της και τη δέσμευση του DNA, αφού η φωσφορυλίωση απαιτείται για τον πυρηνικό εντοπισμό της ενώ η αποφωσφορυλίωση είναι ένα προαπαιτούμενο για τη σύνδεση των πρώτων 25 αμινοξέων της στο πυρηνικό DNA (Reimer et al., 2003). Παρουσιάζει ενζυμική εξειδίκευση σε υποστρώματα που περιλαμβάνουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα να προηγούνται της προλίνης και μικρή ενζυμική δραστηριότητα, τουλάχιστον 100 φορές μικρότερη από εκείνη των κυκλοφιλινών (Uchida et al., 1999). Η δομική ανάλυση της Par14 έχει δείξει ότι διπλώνει σε μια δομή 32 αμινοξέων, η οποία είναι ταυτόσημη με τη δομή της Pin1 (Sekerina et al., 2000). Επίσης, παρουσιάζει 34.5% ομολογία με την *par10* του *E. coli* και 34% ομολογία με την Pin1 (Uchida et al., 1999). Η Par14 εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και όργανα όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, οι πνεύμονες, ο πλακούντας, το ήπαρ, οι νεφροί και το πάγκρεας (Rulten et al., 1999; Uchida et al., 1999). Σχετικά με την κυτταρική της λειτουργία έχει προταθεί ότι συμμετέχει στο σχηματισμό ριβοσωμάτων αφού αλληλεπιδρά με το προ-ριβοσωμικό σύμπλοκο νουκλεοπρωτεϊνών (Fujiyama et al., 2002) και ότι συμμετέχει στην τοποθέτηση του νουκλεοσώματος ή στην έναρξη της μεταγραφής αφού αλληλεπιδρά με κυρτές, δίκλωνες, πλούσιες σε AT περιοχές του DNA (Reimer et al., 2003).

Η Par17 είναι υψηλά συντηρημένη σε όλα τα μετόζωα και στον άνθρωπο και φέρει ενεργότητα ΡΡΪάσης. Κωδικοποιείται από τον ίδιο γενετικό τόπο με την Par14 στο χρωμόσωμα Xq13.1 αλλά μεταγράφεται σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτήν (Müller et al., 2006). Σε αντίθεση με την Par14, η Par17 μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο καθότι στο αμινοτελικό της άκρο έχει μια αλληλουχία 25 αμινοξέων που σχηματίζουν μια  $\alpha$ -έλικα η οποία λειτουργεί ως οδηγός (Kessler et al., 2007). Ο ρόλος της Par17 δεν είναι απόλυτα γνωστός, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη με έναν GTP-εξαρτώμενο ρόλο και προτείνεται ότι εμπλέκεται στον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και προωθεί το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων μέσω της ενεργότητας ΡΡΪάσης της (Thiele et al., 2011).

#### **A.2.2.1.2 Οι παρβουλίνες των φυτικών οργανισμών**

Τρία γονίδια που κωδικοποιούν για παρβουλίνες εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα φυτού *Arabidopsis* και ονομάστηκαν *AtPin1*, *AtPin2* και *AtPin3* αντίστοιχα. Η *AtPin1* εμφανίζει ποσοστό ομολογίας 52% με την *hPin1* και 51% με την *ScEss1* με μόνη διαφορά ότι δεν φέρει τη WW δομική περιοχή στην ακολουθία της όπως και καμία άλλη παρβουλίνη φυτικής προέλευσης. Η *AtPin2* είναι παρόμοια με την Par14 με ποσοστό ομολογίας 53%. Ως εκ τούτου, οι *AtPin1* και *AtPin2* ανήκουν σε διαφορετικούς τύπους παρβουλινών και

μοιράζονται μόνο 32% ομολογία. Η *AtPin3* μοιάζει περισσότερο με τη βακτηριακή παρβουλίνη *Par10*, με ομολογία 39% (He et al., 2004). Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι η *AtPin1* είναι λειτουργικά ισοδύναμη με τις παρβουλίνες τύπου *Pin1* που χαρακτηρίζονται από την εξειδίκευση προς φωσφορυλιωμένα υποστρώματα (Ranganathan et al., 1997; Landrieu et al., 2000). Η *AtPin2* μπορεί να έχει παρόμοιες ιδιότητες με την *Par14*, καθώς μοιράζονται μια παρόμοια περιοχή ΡΡΐάσης και ένα παρόμοιο Ν-τελικό άκρο, εμπλουτισμένο σε βασικά αμινοξέα. Η βασική Ν-τελική περιοχή είναι υπεύθυνη για την τοποθέτηση της μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα που ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσης και της συγγένειας για σύνδεση στο DNA (Reimer et al., 2003). Οι τρεις *AtPin* παρβουλίνες μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: στο ευκαρυωτικό είδος *Pin1*, τον τύπο *Par14*, και τον προκαρυωτικό τύπο. Μεταξύ των τριών παρβουλινών, η *AtPin1* είναι μία πρωτεΐνη με μια δομική περιοχή ενζυμικής κατάλυσης, τον τομέα ΡΡΐάσης. Οι *AtPin2* και *AtPin3* είναι πρωτεΐνες πολλαπλών δομικών περιοχών.

Η *AtPin2* φέρει μια C-τελική περιοχή ΡΡΐάσης και μια περιοχή πλούσια στο αμινοξύ λυσίνη στο αμινοτελικό της άκρο, που μπορεί να έχουν παρόμοιες ρυθμιστικές λειτουργίες με της *Par14*. Η *AtPin3* φέρει στο αμινοτελικό της άκρο το πεπτίδιο 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). Επίσης, βρέθηκε ότι η *AtPin1* ρυθμίζει το χρόνο άνθισης στο *Arabidopsis*, αλληλεπιδρώντας με δύο παράγοντες μεταγραφής της οικογένειας MADS, τον *SOC1* και τον *AGL24* (Wang et al., 2010).

Άλλη φυτική παρβουλίνη τύπου PIN είναι η *MdPin1*, η οποία εντοπίζεται στον πρώιμο καρπό της μηλιάς (*Malus domestica*), διαθέτει ενεργότητα ΡΡΐάσης, εμφανίζει ενζυμική εξειδίκευση για φωσφορυλιωμένα υποστρώματα στη σερίνη, πριν από την προλίνη 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 ΡΡΐάσης (Kouri et al., 2009).

#### **A.2.2.1.3 Οι παρβουλίνες λοιπών οργανισμών**

Η *Ess1* είναι η μόνη παρβουλίνη της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και ήταν η πρώτη ευκαρυωτική παρβουλίνη που απομονώθηκε (Hanes et al., 1989; Hani et al., 1995). Είναι παρβουλίνη τύπου PIN και είναι η μόνη ΡΡΐάση που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της ζύμης (Dolinski et al., 1997). Η *ScEss1* αποτελείται από 150 αμινοξέα και η μοριακή της μάζα είναι 19 kDa. Περιέχει δύο δομικές περιοχές, μια άμινο-τελική περιοχή WW για δέσμευση στο υπόστρωμα και μια καταλυτική περιοχή ΡΡΐάσης που εδράζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (Lu et al., 1996). Επίσης, η *ScEss1* απαιτείται για τη μίτωση, δεδομένου ότι η απώλεια λειτουργίας της *ESS1* στη ζύμη, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μίτωσης και τον κατακερματισμό του πυρήνα (Lu et al., 1996). Ίσως η πιο σημαντική ανακάλυψη στη μελέτη λειτουργίας της *Ess1* στη ζύμη, ήταν η ανακάλυψη ενός νέου δεσμού μεταξύ της *ScEss1* και της μεταγραφής μέσω της RNA πολυμεράσης II (ροΙ RNA II). Πιο αναλυτικά, η *ScEss1* προσδέεται με την *Rpb1* τη μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II η οποία φέρει την επαναλαμβανόμενη ακολουθία της καρβόξυ-τελικής περιοχής (CTD) ισομεριώνοντας το δεσμό μεταξύ *Ser5* και *Pro6* στο επταπεπτίδιο (YSPTSPS) με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων στο σύμπλεγμα της RNA πολυμεράσης II (Singh et al. 2009). Ακόμα, η *ScEss1* αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του συμπλέγματος της αποακετυλάσης των ιστονών (*Sin3-Rpd3*), το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή σημαντικού αριθμού γονιδίων (Arévalo-Rodríguez et al., 2004).

Υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες τύπου PIN όπως είναι 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 *SspI* από το μύκητα *Neurospora crassa* (Metzner et al., 2001).

### A.2.3 Οι προκαρυωτικές παρβουλίνες

Οι παρβουλίνες έχουν εντοπιστεί τόσο σε Gram-αρνητικά όσο και σε Gram-θετικά βακτήρια. Μια καλά μελετημένη παρβουλίνη είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη PrsA του *Bacillus subtilis*. Η PrsA είναι μια λιποπρωτεΐνη συνδεδεμένη με την εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης *B. subtilis* και εντοπίζεται σε πολλά Gram-θετικά βακτήρια (Kontinen and Sarvas, 1993; Vitikainen et al., 2004). Αποτελείται από μια διαμεμβρανική άγκυρα διακυλογλυκερόλης, ένα μεγάλο N-τελικό άκρο που ακολουθείται από έναν τομέα PPIάσης με ομοιότητα προς την οικογένεια των παρβουλινών και ένα μικρό C-τελικό άκρο, ενώ και οι τρεις τομείς είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία της (Vitikainen et al., 2004). Η *BsPrsA* διαθέτει ενεργότητα PPIάσης, ενώ διαθέτει και ενεργότητα τσαπερόνης *in vivo* (Vitikainen et al., 2004). Σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης αποτελεί βασικό συστατικό των κυττάρων αποδεικνύοντας ότι ο ρόλος της είναι απαραίτητος στην αναδίπλωση εξωκυτταροπλασματικών πρωτεϊνών στο διαμέρισμα ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα, ενώ η απουσία της παρεμποδίζει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Vitikainen et al., 2001). Επίσης έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στη σύνθεση του κυλινδρικού πλευρικού τοιχώματος και είναι απαραίτητη, άμεσα ή έμμεσα, για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την πενικιλίνη (PBP, penicillin-binding proteins) (Hyyryläinen et al., 2010).

Ακόμα, σε κάποιους αζωτεδεσμευτικούς μικροοργανισμούς έχει βρεθεί ότι σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του προϊόντος του γονιδίου *nifH* διαδραματίζει μια παρβουλίνη η NifM (Gavini et al., 2006; Howard et al., 1986). Το προϊόν του γονιδίου *nifH* είναι η Fe-πρωτεΐνη, μέρος του συμπλόκου της νιτρογενάσης. Στο *Klebsiella pneumoniae* τα γονίδια *nif* εδράζονται στο χρωμόσωμα και είναι διευθετημένα σε 8 οπερόνια. Η μεταφορά ολόκληρης της περιοχής *nif* στο *E. coli* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργής νιτρογενάσης σε αυτό. Απουσία της NifM η παραγόμενη NifH δεν είναι ενεργή, ενώ μόνο η παρουσία της NifM είναι απαραίτητη για τη λειτουργία και τη σταθερότητα της Fe-πρωτεΐνης (Howard et al., 1986).

Αντίστοιχα, έχει μελετηθεί και η NifM του *Azotobacter vinelandii*. Η *AvNifM* αποτελείται από 292 αμινοξέα και φέρει μια δομική περιοχή παρβουλίνης μήκους 96 αμινοξέων. Διαθέτει ενεργότητα PPIάσης συγκρινόμενη με αυτήν της Par10 (Gavini et al., 2006). Η *AvNifM* έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την NifH και σημαντικό ρόλο στην αναγνώρισή αυτή φαίνεται να έχουν τα πρώτα 126 κατάλοιπα της άμινοτελικής περιοχής της *AvNifM* (Raja et al., 2006). Ακόμα, βρέθηκε ότι στην αλληλεπίδραση αυτή εμπλέκεται η περιοχή γύρω από την P258, που βρίσκεται στην καρβόξυ-τελική περιοχή της NifH, η οποία περιελίσσεται γύρω από την άλλη υπομονάδα του διμερούς της NifH (Gavini et al., 2006).

Στο βακτήριο *E. coli* απαντώνται οι εξής τρεις παρβουλίνες, αντιπροσωπευτικές των προκαρυωτικών: η PpiC (10kDa), η PpiD (68kDa) και η περιπλασμική SurA (47kDa).

#### A.2.3.1 Η προκαρυωτική PpiC

Η πρώτη παρβουλίνη που μελετήθηκε και ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μελέτης των PPIασών στο βακτήριο *E.coli*, είναι η PpiC ή Par10 (Rahfeld et al., 1994a; Rahfeld et al., 1994b). Η PpiC είναι ένα ένζυμο μικρού μεγέθους που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, με μοριακή μάζα 10.1 kDa και αποτελείται

από μόλις 93 αμινοξέα. Φέρει μία μόνο δομική περιοχή που της προσφέρει την ιδιότητα της *cis/trans* προλύλ-ισομεράσης και η οποία αποτελεί την ελάχιστη καταλυτική δομική περιοχή ανάμεσα στα ένζυμα τύπου παρβουλίνης.

Η Par10 παρουσιάζει ισχυρή ενεργότητα PPIάσης *in vitro*, με τη σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilide (λευκίνη) να ανέρχεται στα  $1.69 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Rahfeld et al., 1994a). Νεότερες μετρήσεις της ενεργότητας PPIάσης της PpiC έναντι του ίδιου συνθετικού τετραπεπτιδίου αναφέρουν σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  να είναι ίση με  $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Scholz et al., 1997a). Ακόμα, εμφανίζει ενζυμική εξειδίκευση για υδρόφοβα αμινοξέα όπως η λευκίνη ή η φαινυλαλανίνη πριν από την προλίνη των τετραπεπτιδίων (Rahfeld et al., 1994a), ενώ παρουσιάζει χαμηλή εξειδίκευση για το αμινοξύ που ακολουθεί της προλίνης (Schmidpeter et al., 2011).

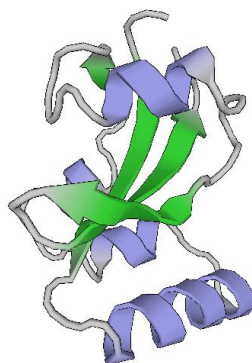
Επίσης, βρέθηκε ότι η φυσική ένωση γιουγλόνη, δεσμεύεται από την PpiC, με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται η ενεργότητα PPIάσης της, μη αντιστρεπτά. Η γιουγλόνη (5-υδροξυ-1,4-ναφθοκινόνη) είναι μία χρωστική ουσία που απομονώνεται από τους καρπούς και τα φύλλα της καρυδιάς (Γένος *Juglans*), έχει αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση και για αυτό αποτέλεσε αντικείμενο εκτεταμένων μελετών ώστε να χρησιμοποιηθεί δυνητικά στη φαρμακευτική. Αποδείχτηκε, ότι η δέσμευση της PpiC με τη γιουγλόνη, οδηγεί στην ομοιοπολική τροποποίηση δύο αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης της Cys41 στο ενεργό κέντρο PPIάσης του ενζύμου και της Cys69, που προκαλούν την αδρανοποίηση της παρβουλίνης (Hennig et al., 1998).

#### A.2.3.1.1 Η δομή της PpiC

Η επίλυση της δομής της PpiC, πραγματοποιήθηκε πειραματικά από τους Kühlewein et al., το 2004. Η PpiC αποτελείται από τέσσερις β-κλώνους οι οποίοι σχηματίζουν μια καμπύλη αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια και τέσσερις α-έλικες. Η κυρτή πλευρά της β-πτυχωτής επιφάνειας περικλείεται από τις α-έλικες 1 και 2, ενώ η κοίλη πλευρά από την α-έλικα 4, με αποτέλεσμα μία αβα-δομή, με την α-έλικα 4 εν μέρει να περικλείεται από την καμπύλη β-πτυχωτή επιφάνεια. Οι α-έλικες 1 και 2 εκτείνονται από τα αμινοξέα E14-G27 και από F30-S38 αντίστοιχα. Οι β-κλώνοι 1 και 2 εκτείνονται από τα αμινοξέα A4-V11 και E51-R53 αντίστοιχα, ενώ οι β-κλώνοι 3 και 4 εκτείνονται από τα αμινοξέα L77-T79 και G82-L89, αντίστοιχα. Επίσης η α-έλικα 3 περιλαμβάνει τα αμινοξέα G43-G47.

Αναλυτικότερα, το N- τελικό άκρο σχηματίζει έναν β-κλώνο, ο οποίος ακολουθείται από ένα μεγάλο τμήμα αποτελούμενο από τρεις α-έλικες. Μία περιοχή βρόχου που περιέχει και έναν σύντομο β-κλώνο, χωρίζει τις τρεις α-έλικες από μια τέταρτη α-έλικα. Το C-τελικό άκρο αποτελείται από ακόμα δύο β-κλώνους που ολοκληρώνουν τη δομή της αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας. Παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι ο τρίτος β-κλώνος περιλαμβάνει έναν δεσμό Gly-Pro, όπου διατηρεί τη *cis* διαμόρφωση.

Η αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια σχηματίζει έναν υδρόφοβο θύλακα πρόσδεσης υποστρώματος. Σε συνδιασμό με την α-έλικα 4, η καμπύλη β-πτυχωτή επιφάνεια σχηματίζει ένα λιπόφιλο διάκενο στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, επιτρέποντας τη δέσμευση ενός λιπόφιλου ολιγοπεπτιδίου. Αν και οι ιδιαιτερότητες του υποστρώματος διαφέρουν για τα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών, ωστόσο η δομή αυτής της περιοχής είναι ιδιαίτερα συντηρημένη (Kühlewein et al., 2004). Τέλος, τα κατάλοιπα αμινοξέων H8, C41 και H84 έχουν συσχετιστεί με την καταλυτική αλληλουχία της Par10 (Kühlewein et al., 2004; Malesevic et al., 2010). Η τριτοταγής δομή της PpiC παρουσιάζεται στην Εικόνα A.2.5.



**Εικόνα A.2.5.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης PpiC του *E. coli*. Διακρίνονται οι β-κλώνοι που σχηματίζουν την αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια με πράσινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 1JNS) (Kühlewein et al., 2004).

#### A.2.3.1.2 Η PpiC εμφανίζεται συντηρημένη

Η ακολουθία της PpiC εμφανίζει ομολογία με αρκετά μέλη της οικογένειας των παρβουλινών, που προέρχονται από τα θηλαστικά, τις ζύμες και τα βακτήρια. Τέσσερις μικροβιακές πρωτεΐνες έχουν βρεθεί να διαθέτουν τομείς που παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την PpiC. Αυτές είναι η παρβουλίνη SurA του *E. coli* (32%), η λιποπρωτεΐνη PrsA του *B. subtilis* (43.8%), η βακτηριακή NifM και η πρωτεάση PrtM του *L. lactis* (26.8%) (Rahfeld et al., 1994b; Moore et al., 1995). Επίσης, παρουσιάζει ομολογία με την Ptf1/Ess1 του *S. cerevisiae* και τις ανθρώπινες παρβουλίνες Pin1 και Par14 (Kühlewein et al., 2004).

Ακόμα, από σύγκριση των κρυσταλλικών δομών, βρέθηκε ότι παρουσιάζει και δομικές ομοιότητες με τομείς άλλων παρβουλινών όπως: των hPin1, του τομέα P2 της SurA, της hPar14 και της φυτικής Pin1 του *Arabidopsis thaliana* (Kühlewein et al., 2004).

#### A.2.3.1.3 Ο ρόλος της PpiC στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Η ενζυμική δραστηριότητα της PpiC όσον αφορά τη συμμετοχή της στη διαδικασία αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως υποστρώμα μια παραλλαγή της ριβονουκλεάσης T1, την RCM-(S54G,P55N)-RNase T1, η οποία φέρει μόνο ένα κατάλοιπο προλίνης στη θέση 39 που υοθετεί τη *cis* διαμόρφωση. Αποδείχθηκε ότι η PpiC καταλύει την ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού της Pro39 και ο σχετικός ρυθμός της διαδικασίας αναδίπλωσης αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσής της. Σημαντικό όμως είναι το γεγονός, ότι η PpiC όχι μόνο καταλύει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης RCM-(S54G,P55N)-RNase T1, αλλά όπως και η FKBP12 (Scholz et al., 1996; Veeraraghavan et al., 1996), επιταχύνει τη δική της αυτοκαταλυόμενη αναδίπλωση (Scholz et al., 1997a). Τα περισσότερα μόρια της παρβουλίνης που δεν βρίσκονται στην αναδιπλωμένη μορφή τους, αναδιπλώνονται με αργούς ρυθμούς γεγονός που υποδηλώνει ότι μία από τις πέντε προλίνες της παρβουλίνης βρίσκεται στη *cis* διαμόρφωση. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω από την ανάλυση της τριτοταγούς δομής της PpiC, φαίνεται ότι ο δεσμός της προλίνης στη θέση 76 βρίσκεται στη *cis* διαμόρφωση (Kühlewein et al., 2004) και πιθανότατα ευθύνεται για την αυτοκαταλυόμενη συμπεριφορά της (Scholz et al., 1997a).

Πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η PpiC αλληλεπιδρά με μια ρεδουκτάση, την AhpC (*alkyl hydroperoxide reductase subunit C*). Υπεύθυνη για αυτή την αλληλεπίδραση εμφανίζεται η περιοχή ενεργότητας PPIάσης της παρβουλίνης, αφού βρέθηκε ότι το τμήμα R119-Q127 της AhpC συνδέεται άμεσα με κατάλοιπα αμινοξέα της PpiC, τα C40, F81, H8 και H84 (Malesević et al., 2010).

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 PpiC (Malesević et al., 2010). Παρατηρήθηκε ότι ιδιαίτερα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου, η βιωσιμότητα του μεταλλαγμένου στελέχους στη φάση εκθετικής ανάπτυξης μειώθηκε σε σύγκριση με εκείνη του στελέχους αγρίου τύπου. Όταν μεταλλαγμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μη βέλτιστες θερμοκρασίες ( $\neq 37^{\circ}\text{C}$ ), παρατηρήθηκε μια αυξημένη ευαισθησία προς το υπεροξείδιο ως παράγοντα στρες. Ενώ, σε περίπτωση απουσίας του παράγοντα στρες, το μεταλλαγμένο στέλεχος της PpiC και το στέλεχος αγρίου τύπου δεν εμφανίζουν οποιεσδήποτε διαφορές στους ρυθμούς ανάπτυξης.

### A.2.3.2 Η προκαρυωτική SurA

Το γονίδιο *surA* αρχικά εντοπίστηκε το 1990, όταν παρατηρήθηκε ότι απαιτείται για την επιβίωση (survival) του *E. coli* κατά τη στατική φάση ανάπτυξης, χωρίς όμως να ταυτοποιηθεί ο βιολογικός ρόλος του γονιδίου αυτού (Tomino et al., 1990). Έξι χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι το γονίδιο της *surA* κωδικοποιεί για μια PPIάση που παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με την παρβουλίνη Par10 και συμμετέχει στο δίπλωμα των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) του κυττάρου (Lazar and Kolter, 1996; Missiakas et al., 1996; Rouvière and Gross, 1996).

Η SurA είναι μια περιπλασμική πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 47 kDa και αποτελείται από 428 αμινοξέα. Αποτελείται από τέσσερις δομικές περιοχές, μία άμινο-τελική περιοχή, δύο επαναλαμβανόμενες δομικές περιοχές παρβουλίνης και μία καρβοξυτελική περιοχή.

Επίσης, η SurA παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης *in vitro*, με τη σταθερά εξειδίκευσης  $\text{kcat/Km}$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilide (λευκίνη) να είναι ίση με  $30 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Μάλιστα η ενεργότητα PPIάσης της αποδίδεται μόνο στη δεύτερη δομική περιοχή παρβουλίνης αφού η πρώτη περιοχή παρβουλίνης φαίνεται ότι είναι ανενεργός. Ωστόσο, αν και διαθέτει ενεργότητα PPIάσης, η κύρια λειτουργία που εμπλέκεται στην ωρίμανση των OMPs είναι αυτή της τσαπερόνης, αφού ταυτόχρονη απαλοιφή των δύο τομέων PPIάσης δεν επηρεάζει τη λειτουργικότητα της *EcSurA* (Behrens et al., 2001).

Η πρώτη απόδειξη συμμετοχής της SurA στην ωρίμανση των OMPs προέκυψε από το χαρακτηρισμό κυττάρων που έφεραν απαλοιφή του γονιδίου *surA*. Από ανεξάρτητες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε  $\Delta\text{surA}$  στέλεχη, αποδείχθηκε η μη σωστή αναδίπλωση ορισμένων σημαντικών πορινών της εξωτερικής μεμβράνης που διαθέτουν τη διαμόρφωση β-βαρελιού (β-barrel OMPs) όπως η LamB, OmpA, OmpC και OmpF. Επιπλέον, η σύνθεση αυτών των πρωτεϊνών σε ένα  $\Delta\text{surA}$  στέλεχος, επηρεάζεται αρνητικά λόγω της συνεχούς επαγωγής του παράγοντα απόκρισης σε εξωκυτταροπλασματικό στρες  $\sigma^E$  (Lazar and Kolter, 1996; Rouvière and Gross, 1996; Missiakas et al., 1996; Sklar et al., 2007). Η μικρότερη ποσότητα των πορινών στην εξωτερική μεμβράνη, αντικατοπτρίζεται από τη μειωμένη πυκνότητα της μεμβράνης στα  $\Delta\text{surA}$  στέλεχη, η οποία οδηγεί σε υψηλά ελαττωματικό κυτταρικό φάκελο (Sklar et al., 2007) και σε υπερευαισθησία στο SDS-EDTA, σε υδρόφοβα αντιβιοτικά καθώς και σε άλατα χολικού οξέος, των οποίων η είσοδος κανονικά αποτρέπει από την εξωτερική μεμβράνη κυττάρων αγρίου τύπου (Lazar and Kolter, 1996; Rouvière and Gross, 1996).

Εκτός από τη συμμετοχή της SurA στην αναδίπλωση των OMPς, έχει προταθεί ότι συμμετέχει και στον μηχανισμό μόλυνσης παθογόνων μικροοργανισμών. Η πρώτη απόδειξη που συνέδεσε τη λειτουργία της SurA με τη μολυσματικότητα, ήταν η παρατήρηση ότι μεταλλάγματα της SurA του παθογόνου *Salmonella enterica* ορότυπος Typhimurium παρουσιάζουν ελαττωματική ικανότητα πρόσδεσης και εισβολής σε ευκαρυωτικά κύτταρα, καθώς και μειωμένη μολυσματικότητα όταν χορηγούνται σε ποντικούς δια του στόματος (Sydenham et al., 2000). Ακόμα, το εντερικό παθογόνο *Shigella flexneri* φαίνεται ότι για την πλήρη μολυσματικότητα του, απαιτεί μια λειτουργική SurA πρωτεΐνη. Παρά το γεγονός ότι ένα μεταλλαγμένο  $\Delta surA$  στέλεχος *Shigella flexneri*, εισβάλλει στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα στο ίδιο επίπεδο με το στέλεχος αγρίου τύπου, παρουσιάζει ελαττωματική εξάπλωση από κύτταρο-προς-κύτταρο, η οποία οφείλεται σε μειωμένο εντοπισμό της κυτταρικής επιφάνειας και σε μειωμένη παρουσία του αυτομεταφορέα της εξωτερικής μεμβράνης ICSA (Purdy et al., 2007).

Επίσης, η λειτουργία μολυσματικότητας της SurA έχει μελετηθεί εκτενώς στο ουροπαθογόνο *E. coli* (UPEC), ειδικά στο στέλεχος UTI89. Η έλλειψη της SurA στο στέλεχος UTI89, επηρεάζει τόσο την προσκόλληση όσο και την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα της ουροδόχου κύστης. Η SurA έχει αποδειχθεί να είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την επιβίωση του UTI89 στελέχους, αφού απαλοιφή του γονιδίου *surA* επιφέρει αποτυχία σχηματισμού ενδοκυτταρικής βακτηριακής κοινότητας (IBC) (Anderson et al., 2003). Αυτά τα ελαττώματα έχουν αποδοθεί στην εμπλοκή της SurA στη βιογένεση των ινιδίων τύπου I, τα οποία είναι σημαντικά τόσο για την αποτελεσματική προσκόλληση και εισβολή των βακτηριακών κυττάρων, όσο και για τον σχηματισμό IBC μέσα στα κύτταρα ξενιστές (Justice et al. 2006; Wright et al., 2007).

Επιπλέον, η μετάλλαξη του *surA* γονιδίου βρέθηκε ότι καταργεί την ικανότητα του UTI89 στελέχους να καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών από καλλιεργημένα ουροεπιθηλιακά κύτταρα (που επάγεται από τους λιποπολυσακχαρίτες), επειδή επηρεάζει την παραγωγή ενός εκκρινόμενου παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την καταστολή της επιθηλιακής απόκρισης κυτοκίνης (Hunstad et al., 2005). Έτσι, η ελαττωματική καταστολή της επαγωγής κυτοκίνης από τα επιθηλιακά κύτταρα που παρουσιάζει ένα μεταλλαγμένο  $\Delta surA$  στέλεχος UTI89, θα το φέρει αντιμέτωπο με μια πιο ισχυρή φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή από ότι ένα στέλεχος UTI89 αγρίου τύπου.

#### A.2.3.2.1 Η δομή της SurA

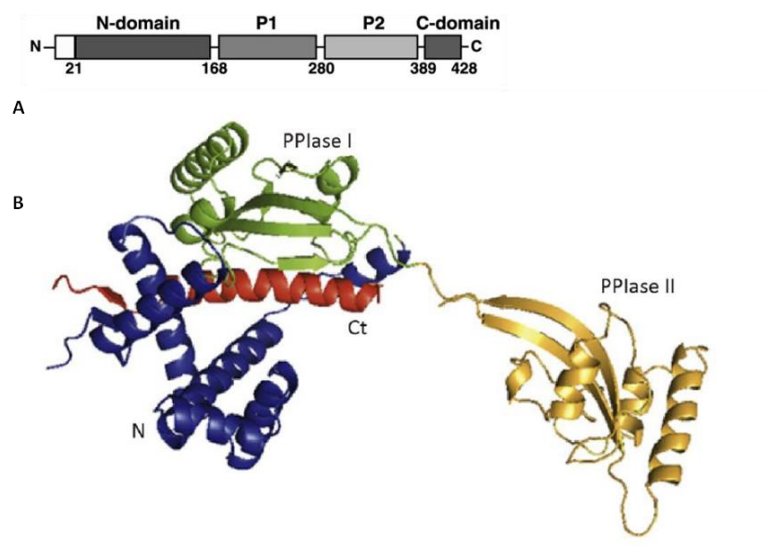
Η δομή της SurA, έχει προσδιορισθεί σε διακριτικότητα 3.0Å, όπου διακρίνονται τέσσερις δομικές περιοχές. Τα πρώτα 20 αμινοξέα αποτελούν ένα τυπικό πεπτίδιο μεταφοράς της στον περιπλασματικό χώρο (πεπτίδιο οδηγός), στη συνέχεια υπάρχει μια άμινο-τελική περιοχή (N) περίπου 150 αμινοξέων, ακολουθούν δύο επαναλαμβανόμενες δομικές περιοχές παρβουλίνης (P1 και P2) και το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (C), μια αλυσίδα 35 αμινοξέων.

Οι τέσσερις δομικές περιοχές στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης σχηματίζουν δύο ξεχωριστές μονάδες. Η N-τελική περιοχή μαζί με την πρώτη περιοχή παρβουλίνης και την C-τελική περιοχή συγκροτούν τη μεγαλύτερη μονάδα σχηματίζοντας μια σφαιρική συμπτυκνωμένη δομή, ενώ η μικρότερη περιοχή παρβουλίνης αποτελεί τη δεύτερη μονάδα, η οποία συνδέεται με την πρώτη μέσω δύο εκτεταμένων πολυπεπτιδικών τμημάτων (25-30 αμινοξέα σε μήκος). Εντός της μεγαλύτερης μονάδας η N-τελική περιοχή αποτελείται από ένα ζεύγος κοντών αντιπαράλληλων β-κλώνων, που ακολουθείται από έξι α-έλικες και μέσω ενός σύντομου συνδέτη ακολουθεί η πρώτη περιοχή παρβουλίνης. Η C-τελική περιοχή αποτελείται από μία μεγάλη α-έλικα (κατάλοιπα αμινοξέων 396-422), η οποία τοποθετείται μεταξύ της N-τελικής περιοχής και της πρώτης περιοχής παρβουλίνης, και ακολουθείται από έναν σύντομο β-κλώνο

(κατάλοιπα αμινοξέων 423-426) που τρέχει αντιπαράλληλα με την  $\alpha$ -έλικα της N-τελικής περιοχής. Λόγω της  $\alpha$ -έλικας η C-τελική περιοχή αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι αυτής της δομής και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα της SurA. Η πρώτη περιοχή παρβουλίνης και η δεύτερη μοιράζονται 32% ομολογία (Bitto and McKay, 2002).

Η μεγαλύτερη υπομονάδα διασχίζεται από μια ευρεία σχισμή η οποία δημιουργεί ένα κανάλι δέσμευσης υποστρώματος με διαστάσεις κατάλληλες για να δεσμεύσει ένα εκτεταμένο τμήμα πολυπεπτιδίου. Η βάση του του καναλιού σχηματίζεται από τις τέσσερις έλικες της N-τελικής περιοχής, την C-τελική περιοχή και την πρώτη περιοχή παρβουλίνης, ενώ η άλλη του πλευρά ορίζεται από μια δομή που μοιάζει με «πετύγιο» και σχηματίζεται από τις υπόλοιπες δύο  $\alpha$ -έλικες της N-τελικής περιοχής (Behrens, 2002).

Οι αλληλεπιδράσεις της C-τελικής περιοχής με την πρώτη περιοχή παρβουλίνης μερικώς φράσσουν την ενεργό θέση στην πρώτη περιοχή παρβουλίνης και προκαλούν διαμορφωτικές διαφορές σε σχέση με την ενεργό δεύτερη περιοχή παρβουλίνης, εξηγώντας πειστικά την καταλυτική αδράνεια της πρώτης. Τέλος, η κρυσταλλική δομή εξηγεί γιατί η διαγραφή της ενεργής δεύτερης περιοχής παρβουλίνης δεν επηρεάζει τη λειτουργία της SurA ως μοριακού συνοδού (Behrens et al., 2001).



**Εικόνα A.2.6.** Η δομική οργάνωση (A) και η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης SurA του *E. coli* (B). Διακρίνονται το αμινοτελικό άκρο (N-terminal), το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal), οι P1 και P2 δομικές περιοχές παρβουλίνης (PDB ID: 1M5Y) (Bitto and McKay, 2002).

#### A.2.3.2.2 Η SurA εμφανίζεται συντηρημένη

Η SurA είναι η πρωταρχική περιπλαστική μοριακός συνοδός που διευκολύνει την αναδίπλωση και συναρμολόγηση πολλών OMP και απαντάται σε πολλές ομάδες βακτηρίων. Η SurA εμφανίζεται εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των  $\gamma$ -Πρωτεοβακτηρίων, αλλά αλληλουχίες της SurA έχουν εντοπιστεί ακόμα στις ομάδες των  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - και  $\epsilon$ - Πρωτεοβακτηρίων, καθώς και σε άλλες ομάδες όπως η *Chlorobiaceae*.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι, ενώ οι SurA αλληλουχίες βρίσκονται σε πολλές ομάδες βακτηρίων και είναι πολύ συντηρημένες, υπάρχουν πολλά ομόλογα της SurA που έχουν μόνο έναν ή κανέναν τομέα PPIάσης. Για παράδειγμα, ενώ έχουν βρεθεί πολλές αλληλουχίες της SurA σε  $\alpha$ -



Πρωτεοβακτηρία (συμπεριλαμβανομένου του *Rickettsia* που αντιπροσωπεύει το πιο κοντινό βακτήριο σε σχέση με τον μιτοχονδριακό πρόγονο) που μοιράζονται μια διατηρημένη N-τελική περιοχή, δεν διαθέτουν τομείς PPIάσης (Alcock et al., 2008). Έτσι, από εξελικτική άποψη, η μονάδα που αποτελείται από τη ν-τελική περιοχή μαζί με την C-τελική περιοχή, μπορεί να αποτελέσει μια κύρια μονάδα για τη γενική δραστηριότητα της μοριακής συνοδού.

Η SurA εμφανίζει αλληλουχική ομολογία με τις άλλες δύο παρβουλίνες του *E. coli*, με την παρβουλίνη PpiC (32%) (Rahfeld et al., 1994b) ενώ η πρώτη περιοχή παρβουλίνης εμφανίζει δομική ομολογία με την PpiD και η δεύτερη περιοχή παρβουλίνης εμφανίζει δομική ομολογία (36%) με την ανθρώπινη παρβουλίνη Pin1 (Bitto and McKay, 2002).

Επίσης η SurA παρουσιάζει δομική ομολογία με αντίστοιχες πρωτεΐνες σε παθογόνα βακτήρια όπως η περιπλασμική LIC12922 του παθογόνου *Leptospira spp.* (Giuseppe et al., 2010) και ο παράγοντας PEB4 (Cj0596) και η περιπλασμική πρωτεΐνη Cj1289 του παθογόνου *Campylobacter jejuni* (Kale et al., 2011).

#### A.2.3.2.3 Ο ρόλος της SurA στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Η SurA διαθέτει ενεργότητα τσαπερόνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, η οποία αποδίδεται στη N-τελική περιοχή της και στην C-τελική περιοχής της, αφού η απαλοιφή των δύο τομέων PPIάσης της σε μια παραλλαγή της SurA η οποία αποτελείται από τη N-τελική περιοχή που συνδέεται άμεσα με την C-τελική ουρά, δεν μειώνει την ικανότητα της ως μοριακής συνοδού (*in vitro*) και επαναφέρει σχεδόν πλήρως το φαινότυπο των  $\Delta surA$  στελεχών (*in vivo*). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η δραστηριότητα PPIάσης της, δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της SurA ως μοριακής συνοδού (Behrens et al., 2001).

Έχει δειχθεί ότι η SurA αλληλεπιδρά προνομιακά *in vitro* με μη-διπλωμένες πορίνες OMPs, σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες παρόμοιου μεγέθους (Behrens et al., 2001; Hennecke et al., 2005), υποστηρίζοντας περαιτέρω ότι η SurA εμπλέκεται στη βιογένεση των OMPs. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η SurA έχει ισχυρή προτίμηση για πεπτιδία με αμινοξέα που φέρουν αρωματικές πλευρικές αλυσίδες διατεταγμένα σε συγκεκριμένη μορφή, όπως Ar-X-Ar (όπου Ar είναι ένα αμινοξύ που φέρει αρωματική πλευρική αλυσίδα και το X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ) και εντοπίζονται σε β-κλώνους, ένα μοτίβο που απαντάται συχνά στο C-τελικό άκρο των OMP πρωτεϊνών (Bitto and McKay, 2003; Hennecke et al., 2005). Αν και η πρώτη δομική περιοχή PPIάσης δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της SurA ως μοριακής συνοδού, ωστόσο δείχθηκε ότι η ειδική δραστηριότητα πρόσδεσης πεπτιδίου της SurA εδράζεται σε αυτή τη δομική περιοχή. Οι Xu et al., 2007, προτείνουν ότι ο πρώτος τομέας PPIάσης είναι σημαντικός για την εξειδίκευση υποστρώματος της SurA και ότι η παραλλαγή της SurA που στερείται τους δύο τομείς PPIάσης, θα μπορούσε εν μέρει να επαναφέρει το φαινότυπο του  $\Delta surA$  στελέχους αλλά με μη ειδική δέσμευση, σε όλες τις OMPs. Επίσης, φαίνεται ότι ο πιο πιθανός λειτουργικός ρόλος του C-τελικού άκρου της SurA είναι να παρέχει διαρθρωτική στήριξη και να μην εμπλέκεται στην αναγνώριση και αλληλεπίδραση του υποστρώματος (Chai et al., 2014), ενώ δείχθηκε ότι τα τελευταία 150 αμινοξέα της N-τελικής περιοχής συμμετέχουν στην πρόσδεση του υποστρώματος και εμπλέκονται στη λειτουργία της SurA ως μοριακής συνοδού (Webb et al., 2001).

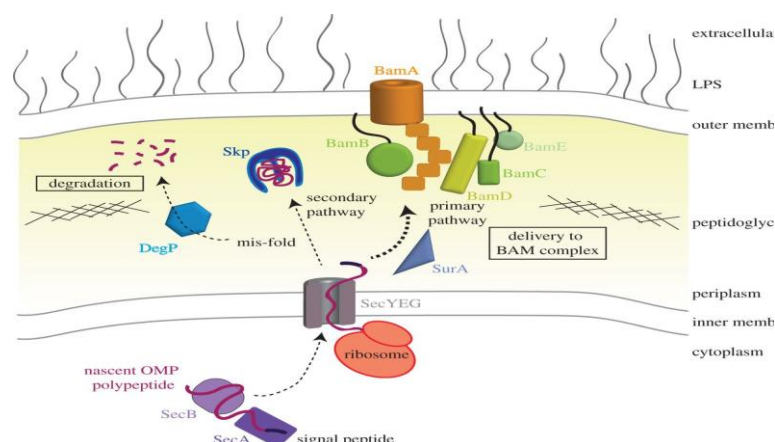
Όπως έχει αναφερθεί η SurA συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση ορισμένων σημαντικών πορινών της εξωτερικής μεμβράνης που διαθέτουν τη διαμόρφωση β-βαρελιού (β-barrel OMPs). Μια διαφορική πρωτεομική μελέτη στην οποία συγκρίθηκαν 64 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, εκ των οποίων 23 ήταν β-barrel OMPs, του στελέχους αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους  $\Delta surA$ , προσδιόρισε το υποσύνολο των OMPs που εξαρτώνται, τουλάχιστον εν μέρει, για τη σωστή αναδίπλωση τους από την

SurA. Αυτές οι OMPs περιλαμβάνουν τις FadL, FecA, FhuA, LptD, OmpX και οι κύριες πορίνες LamB, OmpA and OmpF (Vertommen et al., 2009). Ωστόσο, για τις περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες, η ύπαρξη τους στο στέλεχος *ΔsurA* σε μειωμένη συγκέντρωση, θα μπορούσε να εξηγηθεί από μειωμένη μεταγραφή του γονιδίου τους, που οφείλεται στην ενεργοποίηση της απόκρισης σε στρες μέσω του παράγοντα  $\sigma^E$  (Johansen et al., 2006). Από όλες τις πρωτεΐνες που βρέθηκαν σε μειωμένη συγκέντρωση στο στέλεχος *ΔsurA*, η FhuA και η LptD ήταν οι μόνες πρωτεΐνες οι οποίες δεν συσχετίζονται με μειωμένα επίπεδα mRNA, υποδεικνύοντας ότι αποτελούν αληθινά υποστρώματα της SurA (Vertommen et al., 2009). Η LptD αποτελεί μια απαραίτητη για την επιβίωση πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, η οποία διαθέτει διαμόρφωση β-βαρελίου και συνδέεται με τη λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης LptE, ώστε να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο που μεσολαβεί για την εισαγωγή των λιποπολυσακχαριτών (LPS) στην εξωτερική πλευρά της εξωτερικής μεμβράνης (Freinkman et al., 2011). Μειωμένη έκφραση της LptD, οδηγεί σε ένα φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν του στελέχους *ΔsurA*, προτείνοντας ότι οι περισσότερες από τις διαταραχές που παρατηρούνται στην εξωτερική μεμβράνη του στελέχους *ΔsurA* μπορούν να εξηγηθούν από τα μειωμένα επίπεδα της LptD που παρατηρούνται σε αυτό το στέλεχος (Vertommen et al., 2009).

Εκτός από την SurA έχει βρεθεί ότι και η περιπλασμική μοριακή συνοδός Skp εμπλέκεται με τα πρώιμα βήματα αναδίπλωσης των OMPs. Φαίνεται λοιπόν, ότι υπάρχουν δύο παράλληλα μονοπάτια δράσης των μοριακών συνοδών στο περίπλασμα που αφορούν την ωρίμανση των OMPs. Σύμφωνα με ένα σενάριο, η κύρια οδός περιλαμβάνει την SurA, η οποία μεταφέρει το μεγαλύτερο μέρος των OMPs σε όλο το περίπλασμα και τις παραδίδει στις θέσεις συναρμολόγησης τους στην εξωτερική μεμβράνη, ενώ η Skp και η DegP (περιπλασμική πρωτεάση) λειτουργούν μαζί σε ένα δεύτερο μονοπάτι, το οποίο διασώζει τις OMPs που αποκλείουν από την οδό που περιλαμβάνει την SurA (Rizzitello et al., 2001; Sklar et al., 2007b). Είναι σημαντικό ότι το *E. coli* χρειάζεται για τη βιωσιμότητα του μια από τις δύο οδούς των μοριακών συνοδών, αφού η ταυτόχρονη απαλοιφή των γονιδίων *skp* και *surA* σε στελέχη *ΔskpsurA* και των γονιδίων *degP* και *surA* σε στελέχη *ΔdegPsurA*, επιφέρει έναν συνθετικό θανατηφόρο φαινότυπο (Rizzitello et al., 2001).

Μετά τη διέλευση του περιπλάσματος, οι πρωτεΐνες που καλύπτουν την εξωτερική μεμβράνη συναρμολογούνται τοπικά από τη μηχανή συναρμολόγησης των πορινών με διαμόρφωση β-βαρελίου (σύμπλοκο BAM) μετά την απελευθέρωση από τις μοριακές συνοδούς περιπλασματικά. Το σύμπλοκο BAM διευκολύνει την εισαγωγή και τη συναρμολόγηση των πορινών της εξωτερικής μεμβράνης που διαθέτουν τη διαμόρφωση β-βαρελίου (Voulhoux et al., 2003). Το κεντρικό στοιχείο του συμπλόκου είναι η BamA, η οποία είναι μία πρωτεΐνη με διαμόρφωση β-βαρελίου και η N-τελική περιοχή της διαθέτει πέντε περιπλασματικές περιοχές POTRA (πολυπεπτιδίο που σχετίζεται με τη μετατόπιση). Αυτοί οι τομείς είναι σημαντικοί για την αλληλεπίδραση της BamA με τις τέσσερις BAM λιποπρωτεΐνες που βρίσκονται στο περίπλασμα (BamB, BamC, BamD και BamE). Ωστόσο, μόνο η BamB και η BamD αλληλεπιδρούν άμεσα με την BamA, ενώ οι BamC και BamE σχηματίζουν ένα υποσύμπλοκο με την BamD. Όλο το σύμπλοκο έχει ανασυσταθεί *in vitro*, με τη χρήση της πρωτεΐνης με διαμόρφωση β-βαρελίου OmpT ως πρότυπο υπόστρωμα. Η *in vitro* αντίδραση φάνηκε να απαιτεί SurA και τις πέντε πρωτεΐνες BAM για να προχωρήσει αποτελεσματικά χωρίς καμία πηγή ενέργειας (Hagan et al., 2010; Hagan et al., 2011), υποδεικνύοντας ότι οι πέντε πρωτεΐνες BAM σε συνδυασμό με τη συνοδό SurA αποτελούν τη μικρότερη «μηχανή» που απαιτείται για την εισαγωγή των OMP στην εξωτερική μεμβράνη (Hagan et al., 2011). Η αλληλεπίδραση μεταξύ της SurA και της BamA έχει αποδειχθεί μόνο *in vivo* με τη χρήση χημικών διασυνδετών, υποδηλώνοντας μια παροδική σχέση μεταξύ τους (Vuong et al., 2008; Bennion et al., 2010). Η διαδρομή των νεοσυντιθέμενων OMPs περιγράφεται στην Εικόνα A.2.7.

Τέλος, βρέθηκε ότι η συνέκφραση των περιπλασμικών FkpA και SurA βοηθούν στην αναδίπλωση της Bj-xtrIT β-scorpion νευροτοξίνης (εκκρινόμενη από το σκορπιό) (O'Reilly et al., 2013).



**Εικόνα Α.2.7.** Η διαδρομή των OMP στην εξωτερική μεμβράνη. Αρτιγενείς OMPs (καφέ) συντίθενται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα και παραδίδονται από τους συνοδούς SecA/SecB (μοβ) ή από το ριβόσωμα (κόκκινο) στον μεταθέτη Sec (γκρι) για τη διέλευση της εσωτερικής μεμβράνης. Μόλις εισέλθουν στο περίπλασμα, οι αρτιγενείς OMPs μπορεί να παραδοθούν στο σύμπλοκο BAM από τις περιπλασματικές συνοδούς SurA (σχιστόλιθος) ή Skp (μπλε). Τυχόν OMPs που δεν παρουσιάζουν σωστή διαμόρφωση, κατά τη διάρκεια μεταφοράς τους θα αποδομηθούν από την πρωτεάση DegP (γαλάζιο) ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση (Rollauer et al., 2015).

### Α.2.3.3 Η προκαρυωτική PpiD

Η PpiD είναι η τρίτη παρβουλίνη που έχει μελετηθεί στο *E. coli* και αρχικά απομονώθηκε ως ένας καταστολέας του μεταλλαγμένου φαινότυπου που εμφανίζεται λόγω της απαλοιφής της SurA. Η PpiD αποτελεί μια περιπλασμική πρωτεΐνη 623 αμινοξέων, με μοριακή μάζα 68.15 kDa. Στην άμινο-τελική της περιοχή σχηματίζεται μια  $\alpha$ -έλικα (16-34 κατάλοιπα αμινοξέων) η οποία τη σταθεροποιεί στην εσωτερική μεμβράνη και ακολουθείται από τρεις τομείς που βρίσκονται στον περιπλασματικό χώρο (Dartigalongue and Raina, 1998). Ο πρώτος τομέας (35-263 κατάλοιπα αμινοξέα) και ο τρίτος τομέας (358-623 κατάλοιπα αμινοξέα) πιθανώς εμπλέκονται στη λειτουργία της ως τσαπερόνη και αποτελούνται κυρίως από  $\alpha$ -έλικες. Ενώ, ο δεύτερος τομέας (264-357 κατάλοιπα αμινοξέα) σχηματίζει τη δομική περιοχή παρβουλίνης (Stymest and Klappa 2008).

Αρχικά, είχε βρεθεί ότι η PpiD παρουσιάζει δραστηριότητα PPIάσης (Dartigalongue and Raina, 1998) σε πιο πρόσφατες όμως μελέτες η δραστηριότητα αυτή δεν επαληθεύτηκε (Weininger et al. 2010).

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*) (Rainio and Silhavy, 1999). Και τα δύο συστήματα περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για περιπλασμικές αναδιπλάσεις συμπεριλαμβανομένων των PPIάσεων και των Dsb πρωτεϊνών (Disulfide bond proteins/protein disulphide isomerase like-PDI) (Arie et al., 2001). Η Cpx αντίδραση σε στρες, ελέγχεται από ένα σύστημα δύο συστατικών το οποίο αποτελείται από μια κινάση ιστιδίνης (CpxA) που έχει ρόλο αισθητήρα και έναν κυτταροπλασματικό

ρυθμιστή απόκρισης (CpxR). Το Cpx μονοπάτι ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες στρες όπως είναι το αυξημένο pH, η τροποποιημένη σύνθεση μεμβράνης και η υπερέκφραση πρωτεϊνών που έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα. Έχουν βρεθεί 50 γονίδια σε 34 οπερόνια τα οποία ρυθμίζονται από το σύστημα Cpx (Prais and Raivio, 2008). Στο βακτήριο *E. coli*, η μεταγραφή του γονιδίου *ppiD* ρυθμίζεται από το Cpx δυαδικού συστήματος και τον παράγοντα  $\sigma^{32}$  (Dartigalongue and Raina, 1998). Ο παράγοντας  $\sigma^{32}$  ή  $\sigma^H$  αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή για την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής απόκρισης στο θερμικό σοκ. Η απόκριση στο θερμικό σοκ επιτυγχάνεται αυξάνοντας την ποσότητα του  $\sigma^{32}$  όταν αυξάνεται η θερμοκρασία και μειώνοντας την ενεργότητα του όταν η θερμοκρασία επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Το βασικό σήμα που επάγει την παραγωγή του  $\sigma^{32}$  είναι η συσσώρευση αποδιατεταγμένων (μερικώς μετουσιωμένων) πρωτεϊνών που προκύπτουν από την αύξηση της θερμοκρασίας (Urech et al., 2000). Έτσι, αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι, παρόλο που το γονίδιο *ppiD* κωδικοποιεί μια περιπλαστική πρωτεΐνη, υπόκειται στον έλεγχο του παράγοντα  $\sigma^{32}$ . Γίνεται σαφές, ότι οι πολλαπλές οδοί απόκρισης στο στρες του *E. coli* σε κάποιο βαθμό επικαλύπτονται (Raivio and Silhavy, 2001).

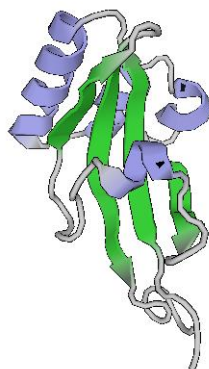
Τέλος, η θέση της PpiD στην εσωτερική μεμβράνη εντοπίζεται κοντά στο μεταθέτη SecYEG. Το σύστημα Sec αποτελεί το καλύτερα μελετημένο σύστημα μεταφοράς πρωτεϊνών διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που αφήνουν το κυτταρόπλασμα εξάγονται στο περίπλασμα ως μη αναδιπλωμένα πολυπεπίδια από τον μεταθέτη Sec, ο οποίος αποτελείται από τρεις εξαιρετικά συντηρημένες υπομονάδες τις SecY, SecE και SecG. Το κύριο μονοπάτι καθοδήγησης των πρωτεϊνών στο μεταθέτη αποτελείται από τις SecA και SecB. Η SecB είναι ένας μοριακός συνοδός που προσδένεται στην αρτιγενή πρωτεΐνη προκειμένου να ρυθμίσει την αναδίπλωσή της. Μεταφέρει την πρωτεΐνη στην SecA, η οποία με τη σειρά της τη μεταφέρει στο μεταθέτη. Η θέση της PpiD κοντά στον μεταθέτη SecYEG υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο της στο περίπλασμα και τη συμμετοχή της στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων που εξάγονται από αυτόν (Antonopaea et al., 2008).

#### A.2.3.3.1 Η δομή της PpiD

Η δομή της PpiD αποτελείται από τέσσερις  $\alpha$ -έλικες (κατάλοιπα αμινοξέα  $\alpha 1$ :279-291,  $\alpha 2$ :295-301,  $\alpha 3$ :306-311,  $\alpha 4$ :325-330) και τέσσερις  $\beta$ -κλώνους που σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια (κατάλοιπα αμινοξέα  $\beta 1$ : 268-276,  $\beta 2$ : 314-319,  $\beta 3$ :338-343 και  $\beta 4$ :348-357) αποκαλύπτοντας μια δομή παρβουλίνης (Weininger et al. 2010). Το N-τελικό άκρο της σχηματίζει έναν  $\beta$ -κλώνο, ο οποίος ακολουθείται από ένα μεγάλο τμήμα αποτελούμενο από τρεις  $\alpha$ -έλικες. Μία περιοχή βρόχου που περιέχει και έναν σύντομο  $\beta$ -κλώνο, χωρίζει τις τρεις  $\alpha$ -έλικες από μια τέταρτη  $\alpha$ -έλικα. Το C-τελικό άκρο αποτελείται από ακόμα δύο  $\beta$ -κλώνους που ολοκληρώνουν τη δομή της αντιπαράλληλης  $\beta$ -πτυχωτής επιφάνειας.

Από την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της, φαίνεται ότι η στροφή μεταξύ  $\beta 3$ - και  $\beta 4$ -κλώνου (κατάλοιπα αμινοξέα 344-347), οι βρόχοι μεταξύ  $\beta 2$ -κλώνου και  $\alpha 4$ -έλικας (κατάλοιπα αμινοξέα 320-324) και μεταξύ  $\alpha 4$ -έλικας και  $\beta 3$ -κλώνου (κατάλοιπα αμινοξέα 331-337) και τα άκρα της αλυσίδας παρουσιάζουν αυξημένη δυναμική.

Ο τομέας παρβουλίνης της PpiD (κατάλοιπα αμινοξέα 264-357) αποτελεί ένα καλά αναδιπλωμένο μονομερές με υψηλή σταθερότητα και έναν απλό μηχανισμό αναδίπλωσης δύο σταδίων. Η περιοχή δέσμωσης υποστρώματος μοιάζει με αυτήν άλλων παρβουλινών και πιθανώς συμμετέχουν τα αμινοξέα: R270, Y271, I273, S308, I323, D325, E326, K328, S345, V346, F348 και L349 (Weininger et al. 2010). Η τριτοταγής δομή της *EcppiD* παρουσιάζεται στην Εικόνα A.2.8.



**Εικόνα Α.2.8.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης PpiD του *E. coli*. Διακρίνονται οι β-κλώνοι που σχηματίζουν την αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια με πράσινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 2KGJ) (Weininger et al., 2010).

#### **Α.2.3.3.2 Η PpiD εμφανίζεται συντηρημένη**

Η PpiD εμφανίζει ομολογία με αρκετά μέλη της οικογένειας των παρβουλινών όχι τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο σε δομικό επίπεδο. Σε επίπεδο αλληλουχίας, ο τομέας παρβουλίνης της PpiD παρουσιάζει χαμηλή ομολογία με την SurA και την Pin1, 34,4% και 26,9%, αντίστοιχα. Όμως στη γενική δομή της η PpiD μοιάζει πολύ με τον καταλυτικά ανενεργό τομέα παρβουλίνης P1 της SurA, όπως και με την Pin1 αφού οι δευτεροταγείς δομές τους είναι σχεδόν πανομοιότυπες. Επίσης η περιοχή δέσμευσης υποστρώματος της PpiD μοιράζεται κοινά αμινοξέα τόσο με την SurA όσο και με την Pin1 αφού οι αντίστοιχες πλευρικές αλυσίδες της πρώτης στην πραγματικότητα κατέχουν παρόμοιες θέσεις με τις πλευρικές αλυσίδες των κατάλοιπων αμινοξέων H178, M231, E238, V263 της SurA και H59, C113, L121, H157 της Pin1 (Weininger et al. 2010).

Ακόμα, η N-τελική περιοχή της PpiD, μοιράζεται ομοιότητα ως προς την αλληλουχία με τη N-τελική περιοχή της SurA (25.2%) και την C-τελική περιοχή της TF (19.9%), όπως επίσης και δομικές ομοιότητες με τις περιοχές των SurA και TF, που παρουσιάζουν ενεργότητα τσαπερόνης (Matern et al., 2010).

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η ειδικότητα πρόσδεσης πεπτιδίου της PpiD επικαλύπτεται με εκείνη της SurA, αλλά είναι λιγότερο ειδική, υποδηλώνοντας ότι η PpiD είναι ικανή να αλληλεπιδρά με ένα ευρύτερο φάσμα υποστρωμάτων (Stymest and Klappa 2008).

#### **Α.2.3.3.3 Ο ρόλος της PpiD στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών**

Η PpiD διαθέτει ενζυμική ενεργότητα τσαπερόνης, αφού βρέθηκε ότι *in vitro* παρεμπόδιζει τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες (45°C) και η ενεργότητα της αυτή δεν εδράζεται στον τομέα παρβουλίνης αλλά στη N-τελική περιοχή της (Matern et al., 2010).

Αρχικά, διατυπώθηκε η άποψη ότι η PpiD (μαζί με την SurA) συμμετέχει στην ωρίμανση των OMPs, αφού η απενεργοποίηση του γονιδίου *ppiD* στα κύτταρα παρουσίασε τους ίδιους φαινότυπους με την

απενεργοποίηση του γονιδίου *surA* και η συνδυασμένη απενεργοποίηση και των δύο γονιδίων είχε θανάσιμες επιπτώσεις για αυτά (Dartigalongue and Raina, 1998). Αργότερα όμως βρέθηκε ότι η απενεργοποίηση και των δύο γονιδίων δεν παρουσιάζει εμφανή προβλήματα στην ανάπτυξη των κυττάρων ενώ η απενεργοποίηση του γονιδίου *ppiD* δεν επηρεάζει τα επίπεδα ωρίμανσης των OMPs της εξωτερικής μεμβράνης (Justice et al., 2005; Matern et al., 2010). Ωστόσο, η θέση εντοπισμού της κοντά στον μεταθέτη SecYEG υποδηλώνει ότι συμμετέχει στα πρώτα στάδια διπλώματος των πρωτεϊνών μόλις αυτές εισέλθουν στον περιπλασματικό χώρο, χωρίς όμως να συμμετέχει στην ωρίμανση των OMPs όπως η SurA. Έτσι προτάθηκε ο ρόλος της PpiD ως «θυρωρού» του μεταθέτη SecYEG στο περίπλασμα (Antonoaea et al., 2008; Matern et al., 2010).

Ο ρόλος αυτός, ενισχύεται με τη φυσική αλληλεπίδραση της PpiD με την πλευρική πύλη του μεταθέτη SecYEG. Η επαφή της PpiD με το μεταθέτη SecYEG ανιχνεύθηκε ότι περιλαμβάνει αρκετά κατάλοιπα αμινοξέα της SecY που βρίσκονται εντός της μεμβράνης, υποδηλώνοντας ότι η επαφή SecY-ppiD συμβαίνει κυρίως μεταξύ της ενιαίας διαμεμβρανικής περιοχής της PpiD με έλικες της πλευρικής πύλης SecY (Sachelaru et al., 2014). Η σημαντικότητα της ενδομεμβρανικής περιοχής της PpiD υπογραμμίζεται από την παρατήρηση ότι μεταλλαγμένη PpiD που στερείται αυτής της περιοχής, δεν είναι σε θέση να καταστείλει τη θνησιμότητα που προκαλείται στα κύτταρα από τη συνδυασμένη απενεργοποίηση των γονιδίων *skr* και *surA*, σε αντίθεση με τη φυσιολογική PpiD που καταστέλλει το φαινότυπο (Matern et al., 2010).

Η δέσμευση της διαμεμβρανικής περιοχής της PpiD με την πλευρική πύλη της SecY, τοποθετεί τον περιπλασματικό τομέα παρβουλίνης, κοντά στον περιπλασματικό προθάλαμο του καναλιού SecY. Έτσι, η PpiD θα μπορούσε να διευκολύνει την ταχεία απελευθέρωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών ή των διαλυτών περιοχών των μεμβρανικών πρωτεϊνών από το κανάλι του μεταθέτη Sec, γεγονός που συμφωνεί με την παρατήρηση ότι η απελευθέρωση της πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης OmpA προς την περιπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης, καθυστερεί στα  $\Delta$ *ppiD* κύτταρα. Η περιπλασματική περιοχή της PpiD θα μπορούσε να βοηθάει στη σφράγιση του καναλιού του μεταθέτη SecYEG, αποτρέποντας την ανεξέλεγκτη ροή ιοντών (Antonoaea et al., 2008).

Επίσης, η PpiD βρέθηκε σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη YfgM που όπως η PpiD, είναι μια πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης η οποία διαθέτει μία μόνο διαμεμβρανική έλικα και μια μεγάλη C-τελική περιπλασματική περιοχή (Maddalo et al., 2011). Η YfgM αλληλεπιδρά με το μεταθέτη SecYEG υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να λειτουργεί σε συνεργασία με την PpiD στο δίκτυο μοριακών συνοδών της περιπλασματικής οδού (Götzke et al., 2014).

#### A.2.4 Οι κυκλοφιλίνες

Οι κυκλοφιλίνες αποτελούν την οικογένεια με τη μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στις PPIάσες. Πρόκειται για πρωτεΐνες υψηλά συντηρημένες κατά την εξέλιξη, εντοπίζονται σε θηλαστικά, φυτά, έντομα, μύκητες, βακτήρια, όλες διαθέτουν ενεργότητα PPIάσης και πολλές φέρουν επιπλέον ενεργότητα τσαπερόνης. Οι κυκλοφιλίνες σχετίζονται δομικά και ανάλογα με τη δυνατότητα να δεσμεύουν την κυκλοσπορίνη A, η οποία διαθέτει ανοσοκατασταλτική δράση που ασκείται από το σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου αποτελούμενο από την κυκλοσπορίνη A (CsA), την κυκλοφιλίνη και την καλσινευρίνη (Borel, 2002). Η κυκλοφιλίνη A (CypA) του ανθρώπου είναι η πρώτη που ανακαλύφθηκε και αποτελεί μια κυτταροπλασματική ή εκκρινόμενη πρωτεΐνη, με ενεργότητα PPIάσης, η οποία

προσδένεται στην κυκλοσπορίνη A (CsA) (Kofron et al., 1991; Liu et al., 1991). Η επαγόμενη ανοσοκατασταλτική δράση της CsA δεν είναι αποτέλεσμα της δέσμευσης της στην CypA, αλλά της αλληλεπίδρασης μεταξύ του συμπλόκου CsA-CypA με την καλσινευρίνη, η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Gallay, 2009). Η αναστολή της καλσινευρίνης εμποδίζει τη μετατόπιση του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (NP-AT) από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, αποτρέποντας έτσι τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 2 (Liu et al., 1991; O'Keefe et al., 1992).

Οι κυκλοφιλίνες εντοπίζονται στα περισσότερα υποκυτταρικά διαμερίσματα και τους περισσότερους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων, των χλωροπλαστών και του πυρήνα, όπου και συντελούν διάφορες λειτουργίες.

Όλες οι κυκλοφιλίνες, μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά όπως μια δομική περιοχή 109 αμινοξέων που ονομάζεται cyclophilin-like domain (CLD), τομέας κυκλοφιλίνης, όπου εδράζεται η ενεργότητα PPIάσης, και περιβάλλεται από τομείς μοναδικούς για κάθε μέλος της οικογένειας που σχετίζονται με την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση και τη λειτουργική εξειδίκευση (Marks, 1996).

#### **A.2.4.1 Οι ευκαρυωτικές κυκλοφιλίνες**

##### **A.2.4.1.1 Οι κυκλοφιλίνες του ανθρώπου**

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 19 κυκλοφιλίνες (Thapar R., 2015), ωστόσο η λειτουργία των περισσότερων εξ' αυτών είναι άγνωστη, ενώ μόνο 7 από αυτές έχουν χαρακτηριστεί ως προς την ενεργότητα PPIάσης τους ή τη σύνδεση τους με την CsA (Wang and Heitman, 2005; Davis et al., 2010).

Η υποκυτταρική θέση ορισμένων κυκλοφιλινών έχει οριστεί, για παράδειγμα η CypA (18 kDa) και η Cyp40 (40 kDa) είναι παρούσες στο κυτταρόπλασμα, η CypB (22 kDa) και η CypC εντοπίζονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, η CypD στα μιτοχόνδρια, η CypE βρίσκεται στον πυρήνα (Wang and Heitman, 2005) και η CypNK (150 kDa), εδράζεται στην επιφάνεια των NK κυττάρων (φυσικά κύτταρα φορείς) (Anderson et al., 1993).

Η CypA είναι μία από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα (περίπου 0.1% του συνόλου των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών) και εμπλέκεται σε μια σειρά κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η διακίνηση, η ανοσοτροποποίηση και η κυτταρική σηματοδότηση (Nigro et al., 2013). Εκκρίνεται από τα κύτταρα αυθόρμητα ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα ή το οξειδωτικό στρες και το εξωκυτταρικό κλάσμα CypA δρα ως ισχυρός προ-φλεγμονώδης μεσολαβητής, ο οποίος διεγείρει φλεγμονώδεις αποκρίσεις και εξασκεί χημειοτακτική δραστηριότητα (Hoffmann and Schiene-Fischer, 2014). Η CypA 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). Η αυξημένη έκφραση της CypA παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως φλεγμονώδεις αντιδράσεις και καταστροφή του χόνδρου στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (Wang et al., 2010) και εξέλιξη των φλεγμονωδών νόσων του πνεύμονα (Agora et al., 2005). Επίσης, υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα και προάγει τη μετάσταση (Yang et al., 2007; Howard et al., 2005).

Η CypB είναι η δεύτερη κυκλοφιλίνη που ανακαλύφθηκε (Price et al., 1991). Η πρωτεΐνη είναι γνωστή για τη συμμετοχή της στα  $Ca^{2+}$  εξαρτώμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Wang and Heitman, 2005). Ενώ, τα εξωκυτταρικά κλάσματα της CypA και CypB εμπλέκονται στην επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου

και στη σηματοδότηση φλεγμονών, ωστόσο, από μόνη της, η CypB φαίνεται ανίκανη να επάγει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (Hoffmann and Schiene-Fischer, 2014). Η CypC, ομοίως με την CypB, εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ παράλληλα εκφράζεται περισσότερο στα νεφρά από ότι στο ήπαρ και στα Τ-κύτταρα.

Η CypD ρυθμίζει τη διαπερατότητα του καναλιού  $Ca^{2+}$  στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, του οποίου η καταστολή παρέχει προστασία έναντι νευροεκφυλιστικών νόσων ενώ επίσης αλληλεπιδρά με την ATP συνθάση των μιτοχονδρίων (Wang and Heitman, 2005). Ακόμα, διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στη συνολική ενεργειακή ομοιόσταση των κυττάρων και είναι κρίσιμη για τη σηματοδότηση του νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου (Nakagawa et al., 2005). Το τελευταίο και μεγαλύτερο μέλος της οικογένειας των κυκλοφιλινών, η CypNK θεωρείται μέρος του συμπλόκου αναγνώρισης όγκων (Wang and Heitman, 2005).

#### A.2.4.1.2 Οι κυκλοφιλίνες των φυτικών οργανισμών

Τα φυτά παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ποικιλία κυκλοφιλινών, αφού το *Arabidopsis thaliana* διαθέτει 29 CYPs (Romano et al., 2004) και το ρύζι διαθέτει 27 (Ahn et al., 2010). Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυκλοφιλίνες στα φυτά είναι γνωστό ότι προκαλείται από μία ποικιλία βιοτικών και αβιοτικών συνθηκών στρες, όπως είναι το φως, η θερμότητα και το σοκ λόγω χαμηλής θερμοκρασίας, το στρες λόγω αυξημένης αλατότητας, τα τραύματα και οι παθογόνες μολύνσεις (He et al., 2004). Οι CYPs εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες ρύθμισης της ανάπτυξης των φυτών.

Η *AtCyp38*, διαθέτει οργάνωση πολλαπλών τομέων και εντοπίζεται στον αυλό των θυλακοειδών των χλωροπλαστών (Fulgosi et al., 1998). Η *AtCyp38* διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη συναρμολόγηση και στη συντήρηση του φωτοσυστήματος II, ενώ έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με τον τον E-βρόγχο της χλωροφυλλικής πρωτεΐνης 47 (CP47), συστατικό του φωτοσυστήματος II (Vasudevan et al., 2012). Μεταλλαγμένα φυτά που φέρουν απαλοιφή του γονιδίου *AtCyp38*, παρουσίασαν 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 *AtCyp40*, αποτελείται από ένα N-τελικό άκρο CYP και μια τριπλέτα TPR C-τελικών επαναλήψεων που διαχωρίζονται από δύο υποθετικά σήματα πυρηνικής στόχευσης, έχει συνδεθεί με τη μετα-μεταφραστική γονιδιακή σίγηση (PTGS) στο *Arabidopsis*. Μεταλλαγμένα φυτά που φέρουν απαλοιφή του γονιδίου *AtCyp40*, παρουσίασαν μειωμένο αριθμό φύλλων και μεταβολή στη μορφολογία των φύλλων τα οποία συνδέονται με μειωμένη δραστηριότητα microRNA (Berardini et al., 2001). Επίσης, όπως και η Cyp40 των θηλαστικών, αλληλεπιδρά και αυτή με την HSP90 μέσα από τους τομείς TPR και η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της *AtCyp40* στα φυτά (Iki et al., 2012).

Οι κυκλοφιλίνες εμπλέκονται και στη γονιδιακή έκφραση. Η *AtCyp71* εντοπίζεται στον πυρήνα και σχετίζεται με τη ρύθμιση της επιγενετικής σίγησης και οργανογένεσης, συμμετέχοντας στη διάταξη της χρωματίνης και στην τροποποίηση των ιστονών (Li and Luan, 2011). Οι *AtCyp95* και *AtCyp63* εντοπίζονται και αυτές στον πυρήνα και συμμετέχουν στον μεταβολισμό του RNA (He et al., 2004).

Οι κυκλοφιλίνες συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση των ορμονών και την ανοσία των φυτών. Η *AtCyp18-3*, που αναφέρεται επίσης και ως ROC1, έχει δειχθεί ότι συνδέεται με την ευαισθησία του φυτοχρώματος και του κρυπτοχρώματος στα μπρασινανοστεροειδή (BR) (Trupkin et al., 2012). Επίσης, σχετίζεται με την ενεργοποίηση της πρωτεάσης Rpt2 της *Pseudomonas syringae*, συμβάλλοντας στην ανοσία του φυτού (Aumuller et al., 2010).



Οι *AtCyp19-4*, *20-1*, *21-1*, *21-2* και *23* προβλέπεται ότι συμμετέχουν σε εκκριτικά μονοπάτια με την *AtCyp19-4* να εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη διακίνηση των κυστιδίων (Saito et al., 1999). Οι *AtCyp18-1*, *18-2*, *18-4*, *19-2* και *22* εντοπίζονται όλες στο κυτταρόπλασμα και παρουσιάζουν πολύ υψηλή ομολογία στη δομική περιοχή CYP τους (He et al., 2004).

Η *AtCyp20-3* ή *ROC4*, που εδράζει στο στρώμα των χλωροπλαστών, συνδέει το φως και τα οξειδοαναγωγικά σήματα με τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης και την απόκριση των χλωροπλαστών στο στρες. Ένα ουσιαστικό ένζυμο στη βιοσύνθεση της κυστεΐνης εντός του χλωροπλάστη, η ακετυλ-μεταφοράση της σερίνης (SAT1), βρέθηκε να αλληλεπιδρά με *AtCyp20-3* (Dominguez-Solis et al., 2008). Μια άλλη κυκλοφιλίνη, η οποία επάγεται υπό συνθήκες καταπόνησης, είναι η *Cyp-45* του σιταριού (*Triticum spp.*) (Sharma and Kaur, 2009), ενώ η κυκλοφιλίνη *Cyp1* 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). Επίσης και η *Cyp25*, το ομόλογο της *AtCyp19-3* (*ROC2*) στο ρύζι, μεσολαβεί σε αρκετές κυτταρικές αποκρίσεις σε πολλαπλές αβιοτικές συνθήκες στρες, όπως είναι η αλατότητα, η ζέστη, το κρύο και η ξηρασία (Trivedi et al., 2013).

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* 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 είναι πιθανό ότι εμπλέκεται στη μεταγραφή και ωρίμανση του pre-mRNA (Gullerova et al., 2006).

#### A.2.4.1.3 Οι κυκλοφιλίνες λοιπών οργανισμών

Στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν εντοπιστεί 8 κυκλοφιλίνες, *Cpr1-Cpr8*. Η κυκλοφιλίνη *Cpr1*, παρουσιάζει 65% ομολογία στην αμινοξική της ακολουθία με την *CypA* και είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα (Haendler et al., 1989). Επίσης, η *Cpr1* συμμετέχει στη ρύθμιση της δραστηριότητας δύο διαφορετικών συμπλόκων ιστόνης-αποακετυλάσης (*Sin3-Rpd3* και *Set3C*) και είναι σημαντική στη διευκόλυνση των μεταγραφικών γεγονότων που είναι αναγκαία κατά τη μετάβαση από τη μιτωτική προς τη μειωτική κυτταρική διαίρεση σε εκβλάστηση ζυμομύκητα (Arevalo-Rodriguez and Heitman, 2005). Οι *Cpr2*, *Cpr3* και *Cpr5* διαθέτουν άμινο-τελικά πεπτίδια οδηγούς, κατευθύνοντάς τες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (*Cpr2* και *Cpr5*) (Koser et al., 1990) και τα μιτοχόνδρια (*Cpr3*) (McLaughlin et al., 1992). Οι *Cpr4* και *Cpr8*, διαθέτουν έναν μόνο τομέα CLD όπως και ένα μακρύ άμινο-τελικό πεπτίδιο οδηγό και εντοπίζονται στα κενοτόπια (Huh et al., 2003). Τέλος, οι *Cpr6* και *Cpr7* είναι ομόλογες της ανθρώπινης πρωτεΐνης *Cyp40* και έχουν μακριές καρβόξυ-τελικές επαναλήψεις TPR οι οποίες τις συνδέουν λειτουργικά με ομόλογες πρωτεΐνες του θερμικού σοκ και άλλες συνοδούς πρωτεΐνες (Duina et al., 1996).

Επίσης, κυκλοφιλίνες ομόλογες της *CypA* έχουν εντοπιστεί και στον παθογόνο μύκητα *Cryptococcus neoformans*, οι *Cpa1* και *Cpa2*. Η *Cpa1* απαιτείται για την ανάπτυξη του μύκητα σε αυξημένες θερμοκρασίες και για την πλήρη έκφραση της παθογένειας, ενώ η *Cpa2* δεν είναι απαραίτητη για αυτές τις λειτουργίες παρουσία της *Cpa1*. Διαγραφή και των δύο γονιδίων οδηγεί σε έναν συνθετικό φαινότυπο, που παρουσιάζει ελάττωμα στην ανάπτυξη και στη μολυσματικότητα (Wang et al., 2001).

Στον οργανισμό *Drosophila melanogaster*, έχουν εντοπιστεί 9 κυκλοφιλίνες (Galat, 2003). Η *NinaA* είναι μια κυκλοφιλίνη ειδική του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, ομόλογη της *CypC* των θηλαστικών, είναι ζωτικής σημασίας για την αναδίπλωση της ροδοψίνης. Μια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την *NinaA* καταλήγει σε ακατάλληλη αναδίπλωση της ροδοψίνης και στην επακόλουθη ανώμαλη έκφραση της πρωτεΐνης (Stamnes et al., 1991).

### A.2.5 Οι προκαρυωτικές κυκλοφιλίνες

Οι κυκλοφιλίνες είναι εξελικτικά συντηρημένες και έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς που αναλύθηκαν μέχρι σήμερα, με εξαίρεση τον μικροοργανισμό *Mycoplasma genitalium* (Göthel and Marahiel, 1999), ενώ στα Αρχαία έχουν βρεθεί 13 κυκλοφιλίνες (Maguyama et al., 2004).

Έχουν εντοπιστεί κυκλοφιλίνες σε διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς. Στο βακτήριο *Mycobacterium tuberculosis*, έχει βρεθεί ότι η PpiA εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης σε ενδοφαγοσωματική θέση, ενώ αναφέρεται ότι η PpiA που προέρχεται από μυκοβακτηριακά παθογόνα διαθέτει μια μοναδική N-τερματική ακολουθία (MADCDSVTNSP) η οποία απουσιάζει στα μη παθογόνα στελέχη. Αυτή η ακολουθία δείχθηκε να είναι απαραίτητη για την έκκριση της πρωτεΐνης (Bhaduri et al., 2014). Ακόμα, στο *Brucella abortus* εντόπιστηκαν δύο κυκλοφιλίνες μια περιπλασματική και μια κυτταροπλασματική, οι BAB1\_1118 (CypA) και BAB1\_1117 (CypB) αντίστοιχα, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή του βακτηρίου σε καταστάσεις στρες και στη μολυσματικότητα. Το μεταλλαγμένο στέλεχος που φέρει απαλοιφή και των δύο κυκλοφιλινών ( $\Delta$ cypAB) επέδειξε αυξημένη ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, το pH, και τα απορρυπαντικά, όπως και μειωμένη μολυσματικότητα και επιβίωση στα κύτταρα-ξενιστές (Roset et al., 2013). Στο βακτήριο του εδάφους *Bacillus subtilis*, έχει εντοπιστεί μια κυκλοφιλίνη, ομόλογη με την PpiB (Herrler et al., 1994).

Ο μικροοργανισμός *E.coli* διαθέτει δύο κυκλοφιλίνες αντιπροσωπευτικές των προκαρυωτών, παρουσιάζοντας ενεργότητα PPIάσης τόσο στο κυτταρόπλασμα (Rahfeld et al., 1994a), όσο και στο περιπλασματικό χώρο (Liu and Walsh, 1990), τις PpiB (18kDa) και PpiA (20.4 kDa) αντίστοιχα.

#### A.2.5.1 Η προκαρυωτική PpiA

Η PpiA, επίσης γνωστή ως ροταμάση A ή κυκλοφιλίνη A, ήταν η πρώτη κυκλοφιλίνη του *E.coli* που ανακαλύφθηκε. Αρχικά εντοπίστηκε ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 190 αμινοξέων (ORF190) ανοδικά του γονιδίου *fic* (που εμπλέκεται στην κυτταρική νηματοποίηση στο *E. coli*), το οποίο βρέθηκε να έχει 35% ομολογία με την ανθρώπινη κυκλοφιλίνη, hcypA (Kawamukai et al., 1989). Αργότερα το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *rotA* και βρέθηκε ότι κωδικοποιεί για την κυκλοφιλίνη A, η οποία υπερεκφράστηκε για πρώτη φορά από τους Liu & Walsh το 1990. Η PpiA αποτελεί μια περιπλασματική πρωτεΐνη 190 αμινοξέων, με μοριακή μάζα 20.4 kDa.

Επίσης, η PpiA εμφανίζει ενεργότητα PPIάσης με τη σταθερά εξειδίκευσης kcat/Km έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide να ανέρχεται στα  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , τιμή όμοια με την αντίστοιχη της CypA (Compton et al., 1992).

Η απενεργοποίηση του γονιδίου *ppiA* κατέδειξε ότι δεν είναι απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση (*non-essential gene*) (Kleerebezem et al., 1995). Η μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης PpiA βρίσκεται υπό τον έλεγχο τεσσάρων προαγωγέων. Οι τρεις από αυτούς ενεργοποιούνται από το cAMP-CRP ρυθμιστικό σύστημα ενώ απενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη καταστολέα CytR. Η ενεργοποίηση αυτών των τριών προαγωγέων πραγματοποιείται με πρόσδεση του cAMP-CRP σε δύο θέσεις που διαχωρίζονται από 53 bp (Nørregaard-Madsen et al., 1994). Ο τέταρτος προαγωγέας ρυθμίζεται από το Cpx δυαδικό σύστημα (*two-component system*) και κατά προτίμηση προσδένεται η φωσφορυλιωμένη CpxR, με το στοιχείο πρόσδεσης να βρίσκεται 5 bp ανοδικά του στοιχείου -35 του βασικού παράγοντα σίγμα  $\sigma^{70}$  (Pogliano et al., 1997).

Αντίθετα με την CypA, η PpiA, παρουσιάζει 1000 φορές μικρότερη συγγένεια για τον αναστολέα κυκλοσπορίνη Α (CsA), με τη σταθερά  $K_i$  να ανέρχεται στα 25-50  $\mu\text{M}$  μια ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση (Compton et al., 1992). Η σύγκριση της αμινοξικής της ακολουθίας με τις ακολουθίες των ευκαρυωτικών κυκλοφιλινών, έδειξε ότι στερείται ένα εξαιρετικά διατηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο τρυπτοφάνης (θέση 121 των ευκαρυωτικών κυκλοφιλινών) και έναντι αυτού έχει ένα κατάλοιπο φαινυλαλανίνης (αντίστοιχη θέση 112). Σημειακή μετάλλαξη στη θέση 112 της PpiA, αντικαθιστώντας τη φαινυλαλανίνη με τρυπτοφάνη F112W, οδήγησε σε 23-πλάσια αύξηση της συγγένειας της για την CsA, υποδηλώνοντας ότι το κατάλοιπο της τρυπτοφάνης αποτελεί σημαντικό παράγοντα αναγνώρισης της CsA (Liu and Walsh, 1991).

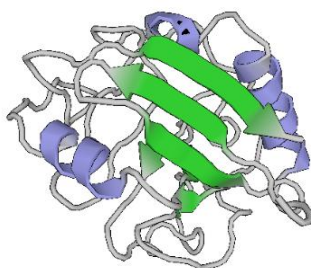
Η PpiA παρουσιάζει αμινοξική ομολογία 50% με την κυκλοφιλίνη PpiB και 25% με διάφορες ευκαρυωτικές κυκλοφιλίνες (ζύμης, μυκήτων, μύγας και θηλαστικών) (Hayano et al., 1991). Επίσης, διαθέτει 35% ομολογία στη δομή με την ανθρώπινη CypA και 27% με την κυκλοφιλίνη του *B. subtilis* (Clubb et al., 1993; Achenbach et al., 1997).

#### A.2.5.1.1 Η δομή της PpiA

Η δομή της PpiA είναι παρόμοια με τη δομή των υπόλοιπων κυκλοφιλινών. Αποτελείται από 8  $\beta$ -κλώνους ( $\beta 1$ :5-10,  $\beta 2$ :15-20,  $\beta 3$ :44-49,  $\beta 4$ :54-57,  $\beta 5$ : 86-90,  $\beta 6$ :103-107,  $\beta 7$ :124-130,  $\beta 8$ :158-165) οι οποίοι σχηματίζουν αντιπαράλληλες  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες σε δομή  $\beta$ -βαρελίου και τέσσερις  $\alpha$ -έλικες. Οι δύο μεγάλες  $\alpha$ -έλικες,  $\alpha 1$ -και  $\alpha 3$ -έλικα ( $\alpha 1$ :26-37,  $\alpha 3$ :132-138) είναι τοποθετημένες στην κορυφή και στον πυθμένα του  $\beta$ -βαρελίου, ενώ υπάρχουν και δύο κοντές  $\alpha$ -έλικες εκ των οποίων η μία (22-25 κατάλοιπα αμινοξέα) βρίσκεται πριν τη μεγάλη  $\alpha 1$ -έλικα και η άλλη  $\alpha 2$ -έλικα ( $\alpha 2$ :112-114) είναι μέρος του τρίτου βρόγχου (Clubb et al., 1993; Clubb et al., 1994).

Ο πυρήνας της δομής  $\beta$ -βαρελίου είναι υδρόφοβος. Η οπίσθια όψη της πρωτεΐνης είναι ομαλή και σχηματίζεται από τους  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - και  $\beta 8$ -κλώνους. Ενώ, η εμπρόσθια όψη της πρωτεΐνης σχηματίζει μια μεγάλη κοιλότητα, όπου οι  $\beta 3$ -,  $\beta 4$ -,  $\beta 6$ - και  $\beta 5$ - κλώνοι σχηματίζουν το κάτω μέρος της κοιλότητας. Το αριστερό τοίχωμα της κοιλότητας σχηματίζεται από το βρόγχο μεταξύ του  $\beta 5$ -και  $\beta 6$ -κλώνου (91-101 κατάλοιπα αμινοξέα), την κοντή  $\alpha 2$ -έλικα και το βρόγχο μεταξύ της  $\alpha 2$ -έλικας και του  $\beta 7$ -κλώνου (115-121 κατάλοιπα αμινοξέα). Η δεξιά πλευρά της κοιλότητας σχηματίζεται από τον μακρύ βρόγχο μεταξύ της  $\alpha 3$ -έλικας και του  $\beta 8$ -κλώνου (144-151 κατάλοιπα αμινοξέα) με τα κατάλοιπα Pro148-Asn151 να βρίσκονται κοντά στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (Clubb et al., 1994).

Η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος βρίσκεται μέσα στην υδρόφοβη κοιλότητα και το ενεργό κέντρο PPIάσης της PpiA σε σχέση με της CypA, είναι υψηλά συντηρημένο υποδηλώνοντας ότι τα πεπτιδικά υποστρώματα δεσμεύονται με τον ίδιο τρόπο από τις δύο κυκλοφιλίνες. Τα κατάλοιπα αμινοξέα Arg92, Thr93 και Gln117 δεν εμφανίζονται συντηρημένα στην PpiA (Clubb et al., 1993). Η τριτοταγής δομή της PpiA παρουσιάζεται στην Εικόνα A.2.9.



**Εικόνα A.2.9.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης PpiA του *E. coli*. Διακρίνονται οι β-κλώνοι που σχηματίζουν τη δομή β-βαρελιού με πράσινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 1CLH) (Clubb et al., 1994).

#### A.2.5.1.2 Ο ρόλος της PpiA στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Η PpiA, όπως και η CypA, έχει βρεθεί ότι καταλύει την *in vitro* αναδίπλωση του θερμικά αποδιατεταγμένου κολλαγόνου τύπου III με τη σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  να ανέρχεται στα  $5.38 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Compton et al., 1992).

Επίσης, η PpiA φαίνεται πως δεν εμπλέκεται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών του περιπλάσματος ή των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης, αφού απενεργοποίηση του γονιδίου *ppiA* δεν επέφερε αλλαγές στην κινητική αναδίπλωσης των περιπλασματικών πρωτεϊνών και άφησε ανεπηρέαστη τη διάταξη των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (Kleerebezem et al., 1995).

Ακόμα, βρέθηκε ότι η AvPpiA του αζωτοδεσμευτικού μικροοργανισμού *Azotobacter vinelandii* παρουσιάζει παρόμοια ενεργότητα PPIάσης με την PpiA, ενώ *in vitro* δεν παρεμπόδιζε τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες (45°C) (Dimou et al., 2011).

Η μόνη ένδειξη ότι η PpiA μπορεί να συμβάλλει στον έλεγχο διαμόρφωσης των πρωτεϊνών, είναι το γεγονός ότι το γονίδιο *ppiA* ρυθμίζεται από το σύστημα Cpx (Pogliano et al., 1997). Ωστόσο, η ακριβής λειτουργία της *in vivo*, δεν είναι ακόμα γνωστή.

#### A.2.5.2 Η προκαρυωτική PpiB

Το δεύτερο μέλος της οικογένειας των κυκλοφιλινών είναι η PpiB η οποία αποτελείται από 164 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα 18kDa. Η PpiB δεν διαθέτει πεπτίδιο-οδηγό και εντοπίζεται στο κυτταρόπλσμα (Hayano et al., 1991).

Η PpiB 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  $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Schönbrunner and Schmid, 1992). Παρόμοια ενεργότητα PPIάσης με την PpiB, έχει παρουσιάσει και η AvPpiB από τον αζωτοδεσμευτικό μικροοργανισμό *Azotobacter vinelandii* (Dimou et al., 2011).

Επίσης, η PpiB όπως και η PpiA, παρουσιάζει 1000 φορές μικρότερη συγγένεια για τον αναστολέα κυκλοσπορίνη A (CsA) σε σύγκριση με την ανθρώπινη CypA, με τη σταθερά  $K_i$  να ανέρχεται στα 25-50  $\mu\text{M}$  μια ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση (Compton et al., 1992).

Ακόμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η PpiB παρουσιάζει αμινοξική ομολογία 50% με την περιπλαστική κυκλοφιλίνη PpiA, 25% με διάφορες ευκαρυωτικές κυκλοφιλίνες (ζύμης, μυκήτων, μύγας

και θηλαστικών) (Hayano et al., 1991) και 34-36% με την ανθρώπινη κυκλοφιλίνη CypA (Trandinh et al., 1992).

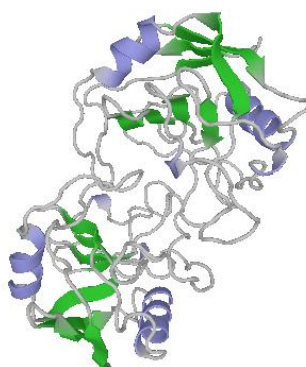
#### A.2.5.2.1 Η δομή της Prib

Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης έχει προσδιορισθεί σε δύο μορφές, το ένζυμο μόνο του και το ένζυμο σε σύμπλοκο με το τριπεπτιδικό υπόστρωμα succinyl-Ala-Pro-Ala-p-nitroanilide (Edwards et al., 1997; Kono et al., 1996).

Η δομή της Prib είναι παρόμοια με τη δομή της ανθρώπινης κυκλοφιλίνης CypA. Όπως και οι υπόλοιπες κυκλοφιλίνες, αποτελείται από 8 β-κλώνους οι οποίοι σχηματίζουν αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες σε δομή β-βαρελιού, περικλείοντας το υδρόφοβο κέντρο και τέσσερις α-έλικες. Οι δύο μεγάλες α-έλικες είναι τοποθετημένες στην κορυφή και στον πυθμένα του β-βαρελιού, ενώ υπάρχουν και δύο κοντές α-έλικες εκ των οποίων η μία βρίσκεται μέσα στον πρώτο μεγάλο βρόγχο (L1:53-79) και η άλλη είναι μέρος του τρίτου βρόγχου (L3:103-120) (Edwards et al., 1997).

Οι διαφορές στις δομές των δύο κυκλοφιλινών του *E. coli* εντοπίζονται στις περιοχές των βρόγχων. Εξάλλου οι τέσσερις περιοχές των βρόγχων (L1-L4) αποτελούν θέσεις για εισαγωγή και απαλοιφή αμινοξέων δίνοντας στις διάφορες κυκλοφιλίνες τις παραλλαγές στη δομή (Kono et al., 1996). Ο τέταρτος βρόγχος (L4:138-154) εμφανίζεται καλά συντηρημένος, πιθανώς γιατί περιέχει δύο κοντούς β-κλώνους (βA και βB). Αυτή η μικρή αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια που δημιουργείται περιέχει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου που προσδίδουν πρόσθετη σταθερότητα στο βρόγχο (Edwards et al., 1997).

Η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος βρίσκεται σε μια υδρόφοβη κοιλότητα στην επιφάνεια του μορίου, η οποία σχηματίζεται από την ανώτερη β-πτυχωτή επιφάνεια (β3,β4,β6 και β7-κλώνοι). Σε αυτήν την κοιλότητα, τα τοιχώματα της υδρόφοβης τσέπης πρόσδεσης σχηματίζονται από τις πλευρικές αλυσίδες πέντε καταλοίπων αμινοξέων, Phe48, Met49, Phe107, Leu108 και Tyr120, ενώ το αμινοξύ Phe99 βρίσκεται στο κάτω μέρος. Έτσι, αυτά τα πέντε υδρόφοβα καταλείπα αμινοξέων και το συντηρημένο κατάλοιπο της φαινυλαλανίνης είναι απαραίτητα για την αναγνώριση του υποστρώματος τόσο στο *E. coli* όσο και στις ανθρώπινες Cyps (Kono et al., 1996). Ακόμα, υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ της Arg43 και της Arg87 και του τριπεπτιδικού υποστρώματος βοηθούν στη σταθεροποίηση του συμπλόκου (Edwards et al., 1997). Η τριτοταγής δομή της Prib παρουσιάζεται στην Εικόνα A.2.10.



**Εικόνα A.2.10.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης Prib του *E. coli*. Διακρίνονται ανά μονομερές οι β-κλώνοι που σχηματίζουν τη δομή β-βαρελιού με πράσινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 2NUL) (Edwards et al., 1997).

### A.2.5.2.2 Ο ρόλος της PpiB στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Η PpiB έχει βρεθεί ότι καταλύει την *in vitro* αναδίπλωση του θερμικά αποδιατεταγμένου κολλαγόνου τύπου III με τη σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  να ανέρχεται στα  $3.92 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Compton et al., 1992) όπως και την αποδιατεταγμένη με ουρία RNase T1 (Schönbrunner et al., 1991). Επίσης βελτιστοποιεί τη λειτουργία μιας ισομεράσης δισουλφιδικών δεσμών (PDI) (Schönbrunner and Schmid, 1992).

Βρέθηκε ότι η απαλοιφή του γονιδίου *ppiB* στο *E. coli*, έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη της αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων από έναν αναστολέα βακτηριοφάγου, τον αναστολέα Grp3.8. Εικάζεται, ότι η PpiB εμπλέκεται στην αναδίπλωση του αναστολέα της ανάπτυξης Grp3.8 και έτσι σε περίπτωση απουσίας της, ο αναστολέας Grp3.8 δεν αναδιπλώνεται σε ενεργή κατάσταση, με αποτέλεσμα μια μη ανασταλτική πρωτεΐνη (Molshanski-Mora et al., 2014).

Η AvPpiB από τον αζωτοδεσμευτικό μικροοργανισμό *Azotobacter vinelandii* παρουσιάζει παρόμοια ενεργότητα PPIάσης με την PpiB, όπως και ενεργότητα τσαπερόνης, αφού *in vitro* παρεμποδίζει τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες (45°C). Ακόμα, βρέθηκε ότι η AvPpiB αλληλεπιδρά με την τσαπερόνη AvDnaK και την υδρολάση AvLpxH (UDP-2, 3-diacetylglucosamine hydrolase) και αυτή της η αλληλεπίδραση οφείλεται κυρίως στην ενεργότητα τσαπερόνης της (Dimou et al., 2011). Η AvPpiB, αλληλεπιδρά επίσης με τις δύο ισομορφές της φωσφορικής ακετυλοτρανσφεράσης, AvPTA-1 και AvPTA-2, και με την καρβοξυλάση της βιοτίνης, AvAccC. Φαίνεται ότι και αυτές οι αλληλεπιδράσεις της AvPpiB οφείλονται κυρίως στην ενεργότητα τσαπερόνης της (Dimou et al., 2012a, Dimou et al., 2012b).

## A.3 Η κινητικότητα των βακτηρίων

### A.3.1 Ομαδική και Κολυμβητική κίνηση σε επιφάνεια

Τα βακτήρια παραδοσιακά θεωρούνται μονοκύτταροι οργανισμοί που αναπτύσσονται ως αυτόνομα άτομα σε ένα περιβάλλον. Πρόσφατα, αυτή η άποψη άρχισε να αλλάζει καθώς έχει διαπιστωθεί ότι τα βακτήρια, υπό συνθήκες, σχηματίζουν βιοϋμένια, εκκρίνοντας μια βλέννα που περιέχει πολυσακχαρίτες και δρουν ως πολυκύτταρες ομάδες. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε επιφάνειες μπορούν να γίνουν ιδιαίτερα κινητικά και να μεταναστεύουν πάνω από το υπόστρωμα, μια διαδικασία γνωστή ως ομαδική κίνηση σε επιφάνεια (*swarming motility*) η οποία αποτελεί έναν ανταγωνιστικό και διαφορετικά ρυθμιζόμενο μηχανισμό από αυτόν του βιοϋμένιου (Verstraeten et al., 2008).

Η ομαδική κίνηση σε επιφάνεια δεν αποτελεί ένα υποχρεωτικό στάδιο ανάπτυξης ούτε είναι αποτέλεσμα μειωμένης πηγής θρεπτικών υλικών (Rauprich et al., 1996). Αυτή η πολυκύτταρη ομαδική συμπεριφορά προαπαιτεί την επαγωγή χημικών και φυσικών σημάτων, που οδηγούν στη φυσιολογική και μορφολογική διαφοροποίηση των βακτηρίων. Η ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια λειτουργικά ορίζεται από έναν ταχύ τρόπο εξάπλωσης των βακτηρίων σε μια επιφάνεια και υποβοηθείται από την περιστροφή των μαστιγίων.

Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί και άλλοι τύποι κίνησης των βακτηρίων, όπως είναι η κολυμβητική κίνηση (*swimming motility*), η οποία επίσης μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή. Η κολυμβητική κίνηση περιλαμβάνει την περιστροφή των μαστιγίων αλλά διαφοροποιείται από την ομαδική κίνηση αφού σε αυτήν την περίπτωση, τα κύτταρα κινούνται μεμονωμένα, σε υδαρές περιβάλλον.

### A.3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση αρχικά παρατηρήθηκε στην επιφάνεια θρεπτικού μέσου στερεοποιημένου με άγαρ σε τρυβλία *Petri* και παραμένει ως η επιφάνεια που επιλέγεται για τη μελέτη αυτής της μορφής κινητικότητας. Η κίνηση περιγράφηκε πρώτη φορά στο βακτήριο *Proteus mirabilis* και σε άλλα είδη του γένους (Henrichsen, 1972) ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των μαστιγοφόρων βακτηρίων (Harshey, 1994) τόσο σε αρνητικά όσο και σε θετικά κατά Gram βακτήρια.

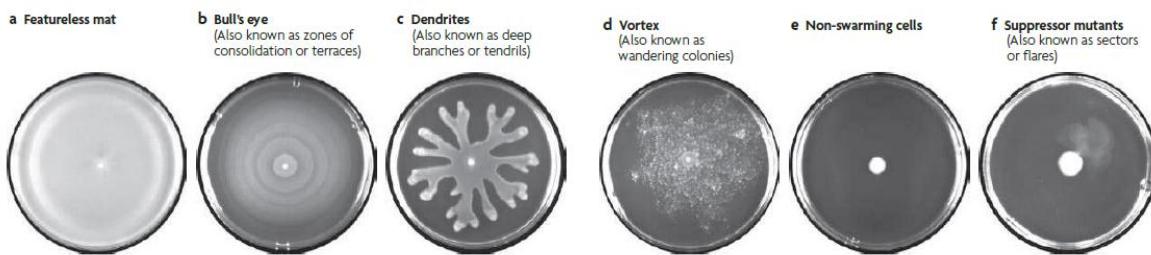
Η συγκέντρωση του άγαρ που υποστηρίζει την ομαδική κίνηση ποικίλλει μεταξύ των γενών. Πολλά γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Salmonella*, *Bacillus* και *Serratia* εμφανίζουν ταχεία ομαδική κίνηση σε συγκέντρωση 0,45 έως 0,8% άγαρ (w/v), αλλά δεν παρουσιάζουν κινητικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άγαρ (Harshey, 1994; Eberl et al., 1996). Γένη όπως τα *Vibrio* και *Proteus* παρουσιάζουν ομαδική κίνηση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άγαρ (1-2%, w/v) και έχουν αναφερθεί να κινούνται σε διάφορες αβιοτικές επιφάνειες (Copeland and Weibel, 2009). Επίσης, ο μικροοργανισμός *E. coli*, ο οποίος αποτελεί το μικροοργανισμό 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). Η ομαδική κίνηση απαιτεί γενικά ένα στέρεο θρεπτικό μέσο, ενεργειακά πλούσιο, αλλά οι συγκεκριμένες συνθήκες που υποστηρίζουν την ομαδική κίνηση εξαρτώνται κάθε φορά από το συγκεκριμένο οργανισμό. Μερικά βακτήρια όπως το *Bacillus subtilis* παρουσιάζει ομαδική κίνηση σε ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών μέσων ενεργειακά πλούσιων, ενώ άλλα βακτήρια, όπως το *Salmonella enterica* και το *Yersinia enterocolitica*, απαιτούν την παρουσία συγκεκριμένων συμπληρωμάτων (για παράδειγμα, γλυκόζης) (Kearns, 2010).

Ένας από τους πιο καθοριστικούς παράγοντες στην ομαδική κίνηση σε επιφάνεια φαίνεται να είναι η παρουσία υγρασίας στο υποκείμενο υπόστρωμα, αφού η ομαδική κίνηση καθοδηγείται από τα μαστίγια, παράγοντας εμπρόσθια κίνηση όπως στην κολύμβηση, με ελικοειδή μαστίγια να πιέζουν το νερό που τα περιβάλλει (Turner et al., 2010). Η υγρασία παρέχεται στα βακτήρια από το εγκλωβισμένο νερό στην πηκτή άγαρ, το οποίο προσελκύουν από αυτήν δημιουργώντας ένα περιβάλλον υψηλής ωσμωτικότητας, εκκρίνοντας ωσμολύτες όπως τα λιποσακχαρίδια (Be'er and Harshey, 2011; Chen et al., 2007). Ο δεύτερος κρίσιμος παράγοντας στην ομαδική κίνηση είναι η επιφανειακή τριβή, η οποία ορίζεται ως μια ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται μεταξύ δύο επιφανειών οι οποίες εφάπτονται (επιφάνεια θρεπτικού μέσου-κύτταρο). Έτσι τα βακτήρια προκειμένου να μπορέσουν να κινηθούν πρέπει να υπερβούν την αντίσταση της τριβής και για αυτό λιπαίνουν τη διεπιφάνεια με τη βοήθεια βιομορίων που παράγουν και αυξάνουν την ώθησή τους με την αύξηση της ισχύος του κινητήρα των μαστιγίων τους. Τέλος, ένας ακόμα καίριος παράγοντας που προκύπτει από την κίνηση είναι η επιφανειακή τάση που θα συναντήσει το υγρό που μετακινείται μαζί με τα βακτήρια, αφού τα μόρια στην επιφάνεια του υγρού έλκονται μεταξύ τους από δυνάμεις συνοχής, εμποδίζοντας τη διαβροχή του μη καταλειμένου θρεπτικού μέσου μπροστά από την προωθούμενη αποικία. Το φαινόμενο αυτό ξεπερνιέται από τα βακτήρια με την παραγωγή επιφανειοδραστικών παραγόντων (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 φυσιολογική και μορφολογική διαφοροποίηση των κυττάρων σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης (*swarmer cells*) (Harshey, 1994). Όταν τα βακτήρια από ένα υγρό μέσο εμβολιάζονται σε στερεή επιφάνεια τότε πριν την έναρξη της κινητικότητας, προηγείται μια λανθάνουσα περίοδος όπου δεν παρατηρείται κινητική συμπεριφορά. Η λανθάνουσα περίοδος για το βακτήριο *P. mirabilis* περιλαμβάνει την ανάπτυξη των κυττάρων, τη διαφοροποίηση στα κύτταρα ομαδικής κίνησης και

τη δυναμική αυτο-συναρμολόγηση των κυττάρων ομαδικής κίνησης σε πολυκύτταρα πακέτα που μεταναστεύουν συλλογικά σε όλη την επιφάνεια (Rauprich et al., 1996).

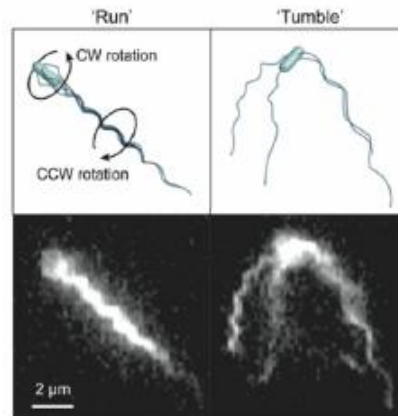
Τα κύτταρα της εξωτερικής ζώνης μιας αναπτυσσόμενης αποικίας *swarming* είναι ταχύτερα (*highly motile*) από τα κύτταρα του εσωτερικού και επιτελούν, ομαδικά και συγχρονισμένα, μια ελικοειδή κίνηση. Έχουν παρατηρηθεί τέσσερα είδη κίνησης των βακτηρίων μιας αποικίας *swarming*: η έμπροσθεν ή ευθεία κίνηση (*straight*), η βραδύνουσα (*stalling*), η πλάγια (*lateral*) και η 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 (Turner et al., 2010).



**Εικόνα A.3.1.:** 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).

Η κολυμβητική κίνηση των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από αλληπάλλληλα μοτίβα ομαλής κίνησης (*smooth runs*) τα οποία διαρκούν περίπου 1 sec και τερματίζονται από μοτίβα αναπήδησης με έναν ταχύ στροφικό ελιγμό (*tumbles*) τα οποία διαρκούν περίπου 0.1 sec (Berg and Brown, 1972). Μετά από μια αναπήδηση, το κύτταρο επιστρέφει πάλι σε μια ομαλή τροχιά αλλά σε μια νέα κατεύθυνση που επιλέγεται σχεδόν τυχαία. Όταν μεμονωμένα κύτταρα *E. coli* εκτελούν την κολυμβητική κίνηση σε ένα ημί-στερεό μέσο χρησιμοποιούν τα μαστίγια τους, τα οποία οδηγούνται στη βάση τους από έναν περιστροφικό κινητήρα (*motor*) (Berg, 2003). Όταν ο κινητήρας περιστρέφεται αντίθετα της φοράς των δεικτών του ρολογιού (CCW), δηλαδή αριστερόστροφα, τα βακτήρια προωθούνται ομαλά, με ταχύτητα 30  $\mu\text{m}$  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). Η συγκέντρωση του άγαρ που υποστηρίζει την κολυμβητική κίνηση είναι  $<0.4\%$  (w/v) [μια τυπική τιμή είναι  $0.3\%$  (w/v)], όπου το μέγεθος του πόρου της πηκτής είναι μεγαλύτερο από την ακτίνα των περισσότερων βακτηριακών κυττάρων με αποτέλεσμα να διεισδύουν μέσα στο δίκτυο του πολυμερούς και να πραγματοποιούν κολυμβητική κίνηση (Copeland and Weibel, 2009).





**Εικόνα A.3.2.:** Μικροσκοπική παρατήρηση (κάτω) και σχηματική αναπαράσταση (επάνω) κυττάρων *E. coli* τα οποία εκτελούν κολυμβητική κίνηση. Η δεξιόστροφη περιστροφή των μαστιγίων προκαλεί το φαινόμενο “tumbling” ενώ η αριστερόστροφη το φαινόμενο “running”(Copeland and Weibel, 2009).

### A.3.1.2. Διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την ομαδική κίνηση

Στα πρώτα στάδια της ομαδικής κίνησης λαμβάνουν χώρα διάφορα φαινόμενα: τα κύτταρα ανιχνεύουν την επιφάνεια και τα εξωκυττάρια σήματα, οι αισθητήρες των κυττάρων μεταδίδουν τα εξωκυττάρια σήματα στα κύτταρα και ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς μηχανισμούς τους και τέλος ρυθμίζονται οι μεταβολικές οδοί που οδηγούν στην προσαρμογή και διαφοροποίηση των κυττάρων, σε κύτταρα ομαδικής κίνησης (*swarmer*). Προσεγγίσεις σε γονιδιακό επίπεδο έχουν δείξει ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων της ομαδικής κίνησης συμπίπτει με τη ρύθμιση μεγάλου εύρους κυτταρικών λειτουργιών (Inoue et al., 2007).

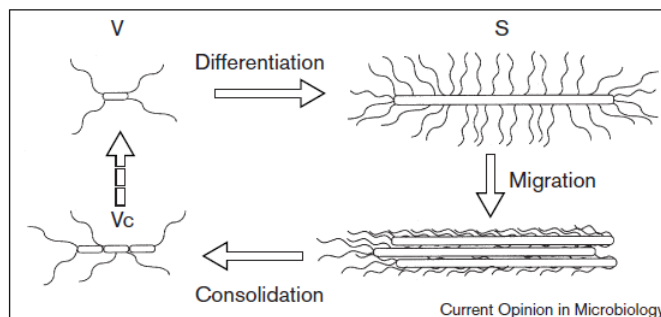
Η διαφοροποίηση βασίζεται στην αυξημένη βιοσύνθεση πλευρικών μαστιγίων (*extensive lateral flagellation*) και την έντονη κυτταρική επιμήκυνση (*filamentation*) ως αποτέλεσμα της αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης (εξαιρούνται του φαινομένου ορισμένα βακτήρια) (Allison and Hughes, 1991; Verstraeten et al., 2008). Τα κύτταρα ομαδικής κίνησης του μικροοργανισμού *P. mirabilis* παρουσιάζουν αυξημένο μήκος από 1-2  $\mu\text{m}$  σε 10-80  $\mu\text{m}$ , αυξημένο αριθμό μαστιγίων (10-50 φορές περισσότερα σε σχέση με τον αριθμό των πλαγκτονικών κυττάρων), ενώ η διαφοροποίηση συνοδεύεται και από αναστολή της κυτταρικής διαφραγματοποίησης, αλλά όχι της σύνθεσης του DNA, αφού τα κύτταρα ομαδικής κίνησης εμφανίζονται πολυπύρρηνα και έχουν την ίδια αναλογία DNA/μήκους κυττάρου όπως τα πλαγκτονικά (Rather, 2005). Επίσης, τα βακτήρια *E. coli* και *S. Typhimurium* διαθέτουν 5-10 περίτριχα μαστίγια ανά κύτταρο, τα οποία διπλασιάζονται στα κύτταρα ομαδικής κίνησης, ενώ το μήκος των κυττάρων του *E. coli* διπλασιάζεται ή τριπλασιάζεται του αρχικού (Harshey and Matsuyama, 1994; Harshey, 1994).

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. Ο ίδιος φαινότυπος εμφανίζεται και στο είδος *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).

Τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης παράγουν και εκκρίνουν εξωπολυσακχαρίδια, τα οποία αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, αφού με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η υγρασία της επιφάνειας και διευκολύνεται η εξάπλωση του βακτηριακού πληθυσμού. Η υγρασία σε μια επιφάνεια αποτελεί ένα σημαντικό εξωκυττάριο σήμα για τη βιοσύνθεση των μαστιγίων. Το μαστίγιο σε πολλά στελέχη βακτηρίων φαίνεται να δρα ως ένας μηχανικός αισθητήρας του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, που αναμεταδίδει σήματα τα οποία επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων και οδηγεί σε κυτταρική διαφοροποίηση (Alavi and Belas, 2001) ενώ έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί και ως αισθητήρας των επιπέδων ενυδάτωσης της εξωτερικής επιφάνειας (Wang et al., 2005).

Στο *E. coli*, τα κύτταρα στην άκρη μιας αποικίας *swarming* είναι τοποθετημένα σε μονή στιβάδα και είναι σχετικά ακίνητα. Τα κύτταρα που βρίσκονται ακριβώς πίσω από τη μονή στιβάδα είναι διαφοροποιημένα και είναι μεταξύ των πλέον ταχέως κινούμενων κυττάρων στην αποικία. Αυτά τα κύτταρα σχηματίζουν συνήθως μία πολυστρωματική στιβάδα, η οποία αποτελείται από στρώματα αρκετού πάχους και συγκρούεται με τα *swarmer* κύτταρα στην άκρη της αποικίας, ανταλλάσσοντας θέσεις με αυτά, ωθώντας έτσι τον πληθυσμό προς τα έξω. Πιο κοντά στο κέντρο της αποικίας, τα κύτταρα γίνονται λιγότερο ευκίνητα και στοιβάζονται σε μια τρισδιάστατη δομή αποτελούμενη από πολλά στρώματα. Αυτή η στιβάδα αποτελείται τόσο από διαφοροποιημένα όσο και από μη διαφοροποιημένα κύτταρα (Harshey, 1994; Harshey, 2003).



**Εικόνα A.3.3.:** Στάδια του κύκλου εξάπλωσης του μικροοργανισμού *Proteus mirabilis*. Τα πλαγκτονικά κύτταρα (V) στην άκρη της αποικίας διαφοροποιούνται σε επιμήκη, υπέρ-μαστιγοφόρα κύτταρα ομαδικής κίνησης (S), που συναρμολογούνται σε πολυκύτταρες σχεδίες και μεταναστεύουν μακριά από την αποικία. Όταν παύει η μετανάστευση, τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης επανέρχονται στην πλαγκτονική τους μορφή (Vc) (Fraser and Hughes, 1999).

### A.3.1.1 Βιοσύνθεση και συναρμολόγηση των μαστιγίων

Η βιοσύνθεση, η συναρμολόγηση και η λειτουργία του μαστιγίου περιλαμβάνει πάνω από 50 γονίδια τα οποία χωρίζονται σε αρκετά οπερόνια (Chilcott, 2000). Η έκφραση αυτού του ρυθμιστόνιου του μαστιγίου, χωρίζεται σε τρεις ομάδες που ιεραρχούνται χρονικά: την πρώτη ομάδα που περιλαμβάνει τα πρώιμα γονίδια (*class I master operon/early genes*), τη δεύτερη ομάδα που περιλαμβάνει τα ενδιάμεσα γονίδια (*class II genes/middle genes*) και την τρίτη ομάδα που περιλαμβάνει τα όψιμα γονίδια (*class III genes*).

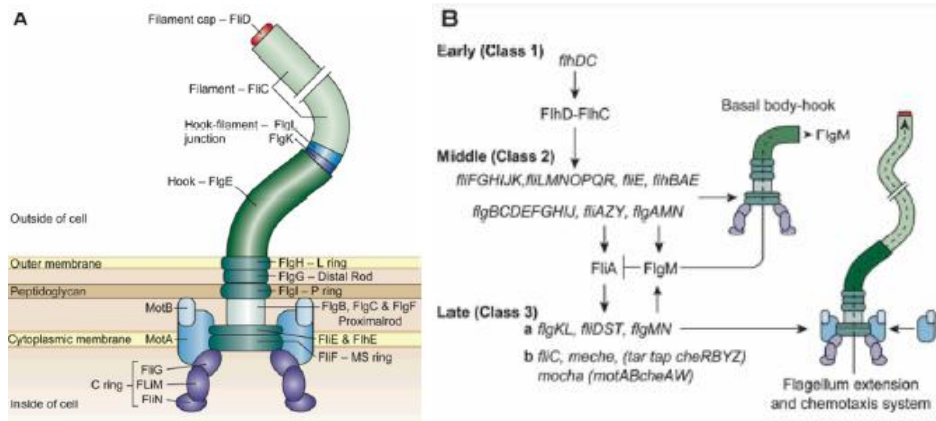
Η πρώτη ομάδα των πρώιμων γονιδίων περιλαμβάνει το *flhDC* οπερόνιο (γονίδια *flhD* και *flhC*), το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή των υπόλοιπων δύο ομάδων. Το πιο καλά μελετημένο *flhDC* οπερόνιο είναι αυτό των βακτηρίων *E. coli*, *S. enterica*, *Serratia*, και *P. mirabilis*. Οι FlhD και FlhC αποτελούν μεταγραφικούς ενεργοποιητές, οι οποίοι συγκροτούν ένα ετεροεξαμερές FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, το οποίο δεσμεύεται ανοδικά του οπερονίου του μαστιγίου, αλληλεπιδρά με το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των ενδιάμεσων γονιδίων (Liu and Matsumura, 1994; Wang et al., 2006). Πειράματα απαλοιφής και συμπληρωματικότητας έχουν δείξει, ότι το *flhDC* οπερόνιο είναι απαραίτητο για την έκφραση των γονιδίων του κύριου σώματος του μαστιγίου, αφού κύτταρα που είχαν απαλοιφή του *flhDC* οπερονίου παρουσιάζονταν χωρίς μαστίγια και ακίνητα (Furness et al., 1997; Liu et al., 2000). Τεχνητή υπερέκφραση του *flhDC*, αυξάνει τον αριθμό των μαστιγίων σε μια ποικιλία βακτηρίων (Eberl et al., 1996; Aldridge et al., 2010). Ακόμα, η υπερέκφραση του *flhDC*, μείωσε τη λανθάνουσα περίοδο της ομαδικής κίμησης στο *P. mirabilis*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η επαγωγή των μαστιγίων είναι ένα σημαντικό γεγονός που λαμβάνει χώρα πριν από την έναρξη της ομαδικής κίνησης (Furness et al., 1997). Τα γονίδια που *flhD-flhC*, μεταγράφονται ως δισιστρονικό οπερόνιο από την RNA πολυμεράση και το γενικό παράγοντα σίγμα  $\sigma^{70}$  (Furness et al., 1997). 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*).

Τα ενδιάμεσα γονίδια είναι υπεύθυνα για 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 επάγεται αφού σχηματιστεί το βασικό σώμα του μαστιγίου και του άγκιστρου και έπειτα από την απελευθέρωση, εκτός του κυττάρου, της πρωτεΐνης FlgM, επιτρέποντας έτσι στον παράγοντα  $\sigma^{28}$  να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή τους, όπως και των γονιδίων της χημειοτακτικής οδού που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των συστατικών του νήματος του μαστιγίου και της κινητικότητας (Chilcott and Hughes, 2000; Copeland and Weibel, 2009).

Το μαστίγιο συναρμολογείται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου με έναν εξαιρετικά οργανωμένο τρόπο. Κάθε μαστίγιο αποτελείται από τρία τμήματα: το βασικό σώμα και τον κινητήρα, το άγκιστρο και το νημάτιο. Το βασικό σώμα είναι το πρώτο δομικό ενδιάμεσο, ενσωματωμένο εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους (C, MS, P και L δακτυλίοι) και μια ράβδο. Οι δακτύλιοι βρίσκονται σε διακριτές περιοχές της μεμβράνης, ο MS στην εσωτερική μεμβράνη, ο P στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, ο L στην εξωτερική μεμβράνη, ενώ ο C είναι ο κυτταροπλασματικός δακτύλιος (Berg, 2003). Ο περιστροφικός κινητήρας των βακτηριακών μαστιγίων αποτελείται από ένα σταθερό τμήμα, το στάτορα, (MotA και MotB) και μία ράβδο (FlgB, FlgC, FlgF και FlgG). Τα συστατικά του στάτορα, MotA και MotB, είναι ακίνητα και ενσωματωμένα στο βασικό σώμα. Ο ρότορας αποτελείται από την πρωτεΐνη FliG και συνδέεται με τον MS δακτύλιο (FliF). Ο ρότορας και ο στάτορας μαζί παράγουν ροπή (Macnab, 2003). Μία κινητήρια δύναμη πρωτονίων, ή σε ορισμένες περιπτώσεις, μια κλίση ιόντων νατρίου, προκαλεί την περιστροφή του κινητήρα. Ο C-δακτύλιος αποτελείται από τις πρωτεΐνες FliG, Flim και FliN και λειτουργεί ως ένας διακόπτης του ρότορα που ελέγχει την κατεύθυνση της περιστροφής του κινητήρα που ενεργοποιεί το μαστίγιο (Copeland and Weibel, 2009). Το άγκιστρο, το οποίο είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από την πρωτεΐνη FlgE και συνδέεται με το νημάτιο (πρωτεΐνες σύνδεσης FlgK και FlgL). Το νημάτιο είναι ένα πολυμερές της πρωτεΐνης φλαγγελλίνης (FliC), η οποία τερματίζει σε μια καλύπτρα (FliD) (Berg, 2003) (Εικόνα A3.3.).

Στον παθογόνο μικροοργανισμό *P. mirabilis* μέσω της μεθόδου μικροσυστοιχιών DNA, διαπιστώθηκε ότι τα περισσότερα γονίδια, των οποίων η έκφραση φαίνεται να αυξάνεται κατά την ομαδική κίνηση συγκριτικά με την πλανκτονική κατάσταση, 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).



**Εικόνα A3.4.:** Δομή, έκφραση και λειτουργία του βακτηριακού μαστιγίου. Α) Απεικόνιση των δομικών συστατικών του μαστιγίου Β) Διάγραμμα της ιεραρχίας της έκφρασης των γονιδίων στο μαστίγιο του βακτηρίου *E. coli* (Copeland and Weibel, 2009).

### A.3.1.3 Έκκριση επιφανειοδραστικών ουσιών

Όπως αναφέρθηκε τα βακτήρια όταν εμβολιάζονται σε μια επιφάνεια καλούνται να υπερπηδήσουν κάποια κρίσιμα εμπόδια ώστε να προάγουν την κίνηση τους επάνω στην επιφάνεια. Έτσι η παρουσία υγρασίας, η επιφανειακή τριβή και η επιφανειακή τάση αντιμετωπίζονται από τα κύτταρα με την παραγωγή και έκκριση εξωκυττάρων βιομορίων. Τα εκκρινόμενα βιομόρια που υποβοηθούν την κίνηση σε επιφάνεια διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

#### Πολυσακχαρίτες

Τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης εκκρίνουν μια εξωκυττάρια μήτρα η οποία αποτελείται από πολυσακχαρίτες, πεπτιδία, πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια (Mireles et al., 2001). Το εξωκυττάριο μίγμα που εκκρίνεται από τον μικροοργανισμό *P. mirabilis* κατά την ομαδική κίνηση αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες (Stahl et al., 1983), ενώ βρέθηκε ότι μεταλλαγμένο στέλεχος που δεν εμφάνιζε ικανότητα ομαδικής κίνησης έφερε απαλοιφή του υπεύθυνου γονιδίου για την παραγωγή πολυσακχαριτών (Gygi et al., 1995). Επίσης, η αύξηση της παραγωγής πολυσακχαριτών του μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus* οδήγησε στη μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης αλλά συνέβαλλε στην αύξηση της ικανότητας αποικισμού επιφανειών, υποδηλώνοντας ότι οι πολυσακχαρίτες επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την ικανότητα της ομαδικής κίνησης σε κάθε μικροοργανισμό (Boles and McCarter, 2002).

### Λιποπολυσακχαρίτες (LPS)

Οι Toguchi et al., 2000, εντόπισαν στελέχη του μικροοργανισμού *S. typhimurium* που δεν εμφάνιζαν ικανότητα ομαδικής κίνησης, στα οποία η βιοσύνθεση των λιποσακχαριτών ήταν ελλατωματική, καθώς έφεραν απαλοιφή του γονιδίου *waaG* που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του πυρήνα της δομής των λιποπολυσακχαριτών, ενώ προτείνουν ότι οι λιποπολυσακχαρίτες επηρεάζουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης του μικροοργανισμού *S. typhimurium* επιδρώντας στην υγρασία της επιφάνειας ανάπτυξης. Πρόσφατα οι Chen et al., 2007, απέδειξαν ότι κύτταρα της ομαδικής κίνησης του *S. typhimurium* χρησιμοποιούν έναν οσμωτικό παράγοντα που μπορεί να είναι LPS, για να εξάγουν υγρό από το αγάρ.

### Λιποπρωτεΐνες/Λιποπεπτίδια

Η διαφοροποίηση των κυττάρων σε κύτταρα ομαδικής κίνησης και η συλλογική τους κίνηση στον μικροοργανισμό *Serratia liquefaciens* MG1, ελέγχεται από το βασικό ρυθμιστή των μαστιγίων το *flhDC* οπερόνιο και τη βιοσυνθετική οδό της διακυτταρικής επικοινωνίας, αντίστοιχα (Eberl et al., 1999). Το σύστημα διακυτταρικής επικοινωνίας του *S. liquefaciens* χρησιμοποιεί την *SwrI* συνθάση του AHL (N-acyl-L-homoserine lactone), τον SwrR μεταγραφικό καταστολέα και έναν υποδοχέα σήματος της AHL συνθάσης. Συλλογικά αυτά τα μόρια ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου *swrA*, που κωδικοποιεί για ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο υπεύθυνο για την παραγωγή της Serrawettin W2. Η Serrawettin W2 αποτελεί ένα κυκλικό λιποπενταπεπτίδιο (*cyclic lipodepsipentapeptide*) που μειώνει την επιφανειακή τάση του νερού και είναι απαραίτητο για την ομαδική κίνηση του *Serratia*. Εξωγενής προσθήκη της Serrawettin W2 στο μέσο ανάπτυξης μεταλλαγμένου στελέχους που φέρει απαλοιφή των γονιδίων *swrI/swrA*, είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση της ικανότητας ομαδικής κίνησης του στελέχους (Eberl et al., 1999; Lindum et al., 1998).

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, 2003, έδειξαν ότι η *surfactin* είναι απαραίτητη για την ομαδική κίνηση σε επιφάνεια του μικροοργανισμού *B. subtilis*. 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).

### Γλυκολιπίδια

Τα ραμνολιπίδια αποτελούν μια κατηγορία αμφίφιλων γλυκολιπιδίων που εκκρίνονται από αρνητικά κατά Gram, παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα βακτήρια, όπως το *P. aeruginosa*. Αυτές οι ουσίες μειώνουν την επιφανειακή τάση των υγρών και εμπλέκονται στην παθογένεια, ενώ εν μέρη είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό φαινόμενο των σπειροειδών μοτίβων (*tendrils*) της αποικίας *swarming* του *P. aeruginosa* (Caiazza et al., 2005). Το βακτήριο παράγει δύο τύπους ραμνολιπιδίων, τα μονο-ραμνολιπίδια (mono-RL) και τα δι-ραμνολιπίδια (di-RL), ενώ εκκρίνει και αλκανοϊκά οξέα (HAA). Έχει βρεθεί ότι το μοτίβο που παρουσιάζει η *swarming* αποικία του *P. aeruginosa* οφείλεται στα δι-ραμνολιπίδια τα οποία προσελκύουν τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης και στα αλκανοϊκά οξέα (HAA) τα οποία λειτουργούν ως αποθητικά των κυττάρων αυτών, ενώ τα μονο-ραμνολιπίδια λειτουργούν ως παράγοντες διαβροχής. Ωστόσο, κανένα από αυτά τα μόρια δεν επηρεάζει την κολυμβητική κίνηση (Tremblay et al., 2007).

### A.3.1.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την απόφαση της κίνησης

#### Χημειοτακτισμός

Η κολυμβητική κίνηση των βακτηρίων σε αυξανόμενης διαβάθμισης συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών αποτελεί το χημειοτακτισμό. Το σύστημα του χημειοτακτισμού συνίσταται από μια κινάση ιστιδίνης που δρα ως αισθητήρας, η οποία μέσω φωσφορυλίωσης ενεργοποιεί αισθητήριους υποδοχείς που μεταβάλλουν τη ροπή του κινητήρα του μαστιγίου, κατευθύνοντας τα κύτταρα σε ευνοϊκότερο, για την επιβίωσή τους, περιβάλλον (Hazelbauer et al., 2008). Η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά είναι ζωτικής σημασίας για την ενεργειακά απαιτητική διαδικασία της ομαδικής κίνησης (Harshey, 2003). Παρόλα αυτά, ο χημειοτακτισμός δεν είναι απαραίτητος για την ομαδική κίνηση ενώ αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της κολυμβητικής κίνησης.

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) ενώ εμφανίζονται αναγκαίοι για την εξάπλωση των μικροοργανισμών *Vibrio parahaemolyticus* και *Rhodospirillum centenum* σε μια επιφάνεια αν και δεν είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση τους (Sar et al., 1990; Jiang et al., 1998).

Στα βακτήρια *E. coli* και *S. typhimurium*, η χημειοτακτική οδός θεωρήθηκε ότι ελέγχει την έκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης των μαστιγίων σε κύτταρα ομαδικής κίνησης, αφού στελέχη που 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 αλλά τα κύτταρά τους φέρουν μικρότερα μαστίγια (Mariconda, et al., 2006; Harshey and Matsuyama, 1994). Ανάλυση σε μεταγραφικό επίπεδο των κυττάρων ομαδικής κίνησης των παραπάνω στελεχών που φέρουν απαλοιφή των *che* γονιδίων, έδειξε ότι μόνο η τελευταία ομάδα (όψιμα γονιδια, *late genes*) της βιοσύνθεσης των μαστιγίων αναστέλλεται και αυτή η αναστολή εντοπίζεται στην αναστολή εξαγωγής της FlgM πρωτεΐνης, που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης των όψιμων γονιδίων δεσμεύοντας τον παράγοντα  $\sigma^{28}$  (Wang et al., 2004). Επίσης, τα στελέχη που φέρουν απαλοιφή των *che* γονιδίων παρουσιάζουν έναν δεύτερο φαινότυπο, σύμφωνα με τον οποίο τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης εμφανίζονται μη ικανά να ενυδατώσουν την αποικία *swarming* (Wang et al., 2005).

Ακόμα, 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).

#### Αίσθηση Πληθυσμιακής Πυκνότητας (*Quorum Sensing*)

Η κυτταρική πυκνότητα είναι πολύ σημαντική για την ομαδική κίνηση σε επιφάνεια ώστε να ξεκινήσει και να συνεχιστεί, έτσι είναι αναμενόμενο να σχετίζεται με το φαινόμενο της αίσθησης της πληθυσμιακής πυκνότητας (QS). Η διαδικασία αυτή (QS) βασίζεται στην παραγωγή μορίων χαμηλής μοριακής μάζας (αυτοεπαγωγείς), των οποίων η εξωκυτταρική συγκέντρωση σχετίζεται με την πληθυσμιακή πυκνότητα του μικροοργανισμού που τα παράγει. Τα κύτταρα μπορούν να αισθανθούν το μόριο-σήμα, το οποίο αφού επιτευχθεί μια κρίσιμη τιμή συγκέντρωσης (που αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη πυκνότητα πληθυσμού) επιτρέπει στο σύνολο του πληθυσμού να ξεκινήσει μια συντονισμένη δράση. Ουσιαστικά οι αυτοεπαγωγείς, δεσμεύονται στον κατάλληλο μεταγραφικό παράγοντα και ακολουθεί ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση κάποιων γονιδίων-στόχων (Smith et al., 2004). Τα Gram-αρνητικά και τα Gram-θετικά

βακτήρια χρησιμοποιούν διαφορετικούς αυτοεπαγωγείς για τη μέτρηση της πυκνότητας του πληθυσμού τους (Daniels et al., 2004).

Η διακυτταρική επικοινωνία χρησιμοποιώντας ως σήμα τη ν-άκυλο-ομοσερίνη (AHL), αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς μηχανισμούς επικοινωνίας μεταξύ των βακτηρίων και είναι ευρέως διαδεδομένος στα Gram-αρνητικά βακτήρια (Fuqua et al., 1996). Η σύνθεση των επιφανειοδραστικών ουσιών στα βακτήρια *Serratia*, *P. aeruginosa* και *B. Subtilis* υπόκειται στον έλεγχο του QS μηχανισμού (Daniels et al., 2004). Το βακτήριο *P. aeruginosa* διαθέτει δύο συστήματα διακυτταρικής επικοινωνίας χρησιμοποιώντας το AHL, τα Las και Rhl όπου το καθένα διαθέτει τη δική του AHL συνθάση (LasI και RhlI) και το δικό του μεταγραφικό ρυθμιστή (LasR και RhlR). Τα AHL σήματα που παράγονται από τις συνθάσες είναι τα N-(3-oxododecanoyl)-HSL και N-butyl-HSL, αντίστοιχα (de Kievit 2009). Ο κύριος ρυθμιστής της ομαδικής κίνησης στο συμβιωτικό βακτήριο *Rhizobium etli* είναι το σύστημα μακράς αλυσίδας AHLs/cinIR, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο αυτοεπαγωγέας (μακράς αλυσίδας AHLs) λειτουργεί και ως επιφανειοδραστικός παράγοντας (Daniels et al., 2006).

Ο QS μηχανισμός επιτρέπει τη διακυτταρική επικοινωνία και 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). Ένα από τα συστήματα που χρησιμοποιεί το *E. coli* είναι το σύστημα των AI-3/ QseBC μέσω του οποίου ρυθμίζεται η μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου των μαστιγίων και διαφοροποιούνται τα κύτταρα κατά την ομαδική κίνηση (Sperandio et al., 2002).

Ο QS μηχανισμός διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο και στο σχηματισμό του βιοϋμενίου αφού η επιτυχής προσκόλληση ενός γένους βακτηρίων ή ακόμα και διαφορετικών σε μία επιφάνεια, οφείλεται στη μεταξύ τους ανταλλαγή χημικών σημάτων. Επίσης, μέσω του QS μηχανισμού διευκολύνεται η πρόσβαση σε θρεπτικά στοιχεία και έτσι δημιουργείται ένα ευνοϊκότερο περιβάλλον, για την ανάπτυξη του βιοϋμενικού βακτηριακού πληθυσμού.

Στο στέλεχος *P. aeruginosa* PAO1 αμφότερα τα δύο προαναφερθέντα συστήματα Las και Rhl είναι σημαντικά για την απελευθέρωση του εξωκυτταρικού DNA, το οποίο παίζει ρόλο στη δημιουργία του πλέγματος (*biofilm matrix*) (Allesen-Holm et al, 2006). Στο στέλεχος *P. aeruginosa* PA14 το σύστημα Las είναι απαραίτητο για την αρχιτεκτονική του βιοϋμενίου πιθανώς μέσω του ελέγχου παραγωγής του εξωπολυσακχαρίτη PEL (Yang L. et. al., 2007). Για το βακτήριο *B. subtilis*, η διακυτταρική επικοινωνία επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ως σήμα τη σουρφακτίνη, της οποίας η παραγωγή και η έκκριση είναι σημαντική για το σχηματισμό βιοϋμενίου (Lopez et al., 2009a). Το βακτήριο *E. coli* χρησιμοποιεί τέσσερα διαφορετικά 2CS συστήματα: το sdiA ομόλογο του LuxR σύστημα, το luxS/ autoinducer-II σύστημα, το σύστημα autoinducer-III/επινεφρίνη/νορεπινεφρίνη και ένα σύστημα μεσολάβησης με ινδόλη (Lavery et al., 2014). Ο αυτοεπαγωγέας AI-2 αυξάνει την κινητικότητα και διεγείρει το σχηματισμό του βιοϋμενίου στο στέλεχος *E. coli* K-12 αγρίου τύπου (Gonzalez Barrios et al., 2006). Η ινδόλη, η οποία αποτελεί προϊόν της τρυπτοφάνης, 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 τη 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., 2007b).

### *c-di-GMP* σηματοδότηση

Το κυκλικό-di-GMP (*c-di-GMP*) ή bis-(3',5')-cyclic diguanylic acid αποτελεί ένα σημαντικό μόριο σηματοδότησης για τη μετάβαση μεταξύ των στατικών και κινητικών μορφών βακτηριακής ζωής (Krasteva et al., 2012). Τα υψηλά επίπεδα *c-di-GMP*, παρεμποδίζουν την κινητικότητα και προωθούν το σχηματισμό βιοϋμενίου, ενώ τα χαμηλά επίπεδα ευνοούν τις κινητικές συμπεριφορές. 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). Το βακτήριο *E. coli* διαθέτει 19 πρωτεΐνες με το χαρακτηριστικό μοτίβο GGDEF (Méndez-Ortiz et al., 2006). Επίσης, ένας τομέας που ονομάζεται PilZ εντοπίστηκε μέσω βιοπληροφορικής σε αρκετές πρωτεΐνες GGDEF ή/και EAL, και ιδίως στις BcsA και YcgR πρωτεΐνες του *E.coli*, ως μια πιθανή περιοχή αλληλεπίδρασης με το *c-di-GMP* (Amikam και Galperin, 2006). Το βακτήριο *S. typhimurium* κατέχει 19 πρωτεΐνες και το *P. aeruginosa* διαθέτει 38 (Römling, 2005).

Τα γονίδια που 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, ενώ συναντώνται σπανίως στα αρχαία και ευκαρυωτικά κύτταρα με αποτέλεσμα να αποτελούν στόχους για την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων ή παραγόντων καταστολής του βιοϋμενίου (Galperin, 2004).

Το *c-di-GMP* αναστέλλει την κινητικότητα των μαστιγίων, επηρεάζοντας τόσο το επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης όσο και το επίπεδο της συναρμολόγησης ή λειτουργίας τους (Wolfe and Visick, 2008). Η διατήρηση χαμηλών επιπέδων *c-di-GMP*, είναι ζωτικής σημασίας για την κινητικότητα των μαστιγίων. Στο βακτήριο *V. parahaemolyticus*, το οπερόνιο *scrABC* κωδικοποιεί τόσο έναν αυτοεπαγωγέα όσο και ένα σύστημα *c-di-GMP*-ρύθμισης, το οποίο αυξάνει τη δραστηριότητα της φωσφοδιεστεράσης ως απόκριση της ανάπτυξης σε μια επιφάνεια, μειώνοντας τα επίπεδα *c-di-GMP* και αυξάνοντας έτσι την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ομαδική κίνηση (Ferreira et al., 2008). Στα βακτήρια *E.coli*, *Salmonella* και *B. subtilis*, το *c-di-GMP* βρίσκεται σε σύμπλοκο με μια πρωτεΐνη υποδοχέα που αλληλεπιδρά άμεσα με τον κινητήρα του μαστιγίου επάγοντας την CCW κίνηση και αναστέλλοντας το χημειοτακτισμό ή/και θέτοντας φρένο στον κινητήρα. Περιβαλλοντικά σήματα που αυξάνουν τα επίπεδα του *c-di-GMP* και αναστέλλουν την ομαδική κίνηση δεν είναι γνωστά (Partridge and Harshey, 2013).

Ακόμα, το *c-di-GMP*, αποτελεί ένα διαβιβαστή και συμμετέχει σε αρκετές διαδικασίες που συνδέονται με τη δημιουργία του 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.

#### **A.3.1.5 Γονίδια που εμπλέκονται στην ομαδική κίνηση**

Μελέτη φαινοτυπικού χαρακτηρισμού στελεχών του μικροοργανισμού *E. coli* τα οποία φέρουν μοναδική απαλοιφή (*single gene knock-out*) για 3.985 γονίδια σε συνθήκες ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια, υπέδειξε ότι 216 από αυτά εμπλέκονται στο συγκεκριμένο φαινότυπο. Τα γονίδια που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα κατατάσσονται σε διάφορες λειτουργικές κατηγορίες, υποδεικνύοντας ότι η ομαδική κίνηση είναι μια εξειδικευμένη μορφή κινητικότητας που απαιτεί μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών δραστηριοτήτων. Τα γονίδια λοιπόν, συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs, στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στη μεταγωγή σήματος, στην απόκτηση σιδήρου και στη βιοσύνθεση



συστατικών της κυτταρικής επιφάνειας όπως λιποσακχαριτών (Inoue et al., 2007). Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για άλλους μικροοργανισμούς.

Κατά την ομαδική κίνηση του μικροοργανισμού *P. aeruginosa* ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών από δείγμα RNA προερχόμενο από το άκρο της αναπτυσσόμενης αποικίας *swarming*, υπέδειξε ότι τα επίπεδα συσσώρευσης μεταγραφημάτων γονιδίων που συμμετέχουν στην παραγωγή ριβοσωμικών πρωτεϊνών και στη σύνθεση του ATP αυξάνονται, ενώ μειώνονται τα επίπεδα συσσώρευσης μεταγραφημάτων γονιδίων που σχετίζονται με την έκκριση παραγόντων παθογένειας ή γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση σιδηροφόρων, γονιδίων σχετικών με λειτουργίες του χημειοτακτισμού και την παραγωγή παμνολιπιδίων. Ακόμα, η ανάλυση από δείγμα RNA προερχόμενο από το κέντρο της αναπτυσσόμενης αποικίας *swarming*, διαπιστώθηκε ότι αυξάνονται τα μεταγραφήματα γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση σε οξειδωτικό στρες (Tremblay and Déziel, 2010).

Επίσης, αναφορικά με τα 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 το σχηματισμό βιοϋμενίου (Overhage et al., 2007). Ενώ η κινάση ιστιδίνης PA4398 που δρα ως αισθητήρας, βρέθηκε ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της ομαδικής κινητικότητας και το σχηματισμό βιοϋμενίου στο *P. aeruginosa* PA14. Μεταλλαγμένο στέλεχος που φέρει απαλοιφή του PA4398 γονιδίου παρουσίασε σημαντικά μειωμένη ικανότητα ομαδικής κίνησης, ενώ η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου διπλασιάστηκε παρουσιάζοντας 50% υψηλότερα επίπεδα c-di-GMP από ό,τι τα κύτταρα αγριου τύπου. Συγκριτική ανάλυση μικροσυστοιχιών σε κύτταρα ομαδικής κίνησης του μεταλλαγμένου στελέχους και του στελέχους αγριου τύπου, κατέδειξε ότι 64 γονίδια ρυθμίζονταν διαφορετικά στα δύο στελέχη. Αποδείχθηκε ότι απορρυθμίζονταν γονίδια που εμπλέκονταν στη σύνθεση και την υποβάθμιση του c-diGMP, όπως και γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή των σιδηροφόρων pyoverdine και pyochelin, δείχνοντας ότι τα γονίδια *pvdQ* αλλά και *pvdR*, *fptA*, *PCHA*, *pchD*, και *pchH* είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική συμπεριφορά ομαδικής κίνησης του στελέχους *P. aeruginosa* PA14 (Strehme et al., 2015).

Ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των κυττάρων της ομαδικής κίνησης του *B. cereus* ATCC 14579, υπέδειξε ότι μεταβάλλεται η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, ωστόσο δεν τροποποιείται δραματικά η έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο βασικό μεταβολισμό των κυττάρων. Ενώ, δεδομένα μικροσυστοιχιών DNA υπέδειξαν διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά του καλίου, γονιδίων προφάγων και ορισμένων συντηρημένων υποθετικών γονιδίων των οποίων η λειτουργία μένει να καθοριστεί (Salveti et al., 2011).

Ακόμα, πρωτεομική μελέτη σε κύτταρα ομαδικής κίνησης του *S. Typhimurium* υπέδειξε ότι αυξήθηκαν τα ένζυμα που σχετίζονται με τον αναβολισμό, ενώ τα ένζυμα που εμπλέκονται στον καταβολισμό των πεπτιδίων ρυθμίζονται αρνητικά σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Επίσης, η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης μειώνεται σε κύτταρα ομαδικής κίνησης, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν να βασίζονται σε *de novo* βιοσυνθετικές οδούς για την απόκτηση αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, αντί εισαγωγής τους (Kim and Surette, 2004). Ενώ, ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των κυττάρων ομαδικής κίνησης του *S. typhimurium* υπέδειξε ότι ρυθμίζεται θετικά η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου και στη βιοσύνθεση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) (Wang et al., 2004).

### A.3.2 Βιοϋμένιο

#### A.3.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του σχηματισμού βιοϋμενίου

Μια κοινή στρατηγική που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια ώστε να επιβιώνουν σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι να αναπτύσσονται σχηματίζοντας αρχιτεκτονικά συγκροτήματα κοινοτήτων, που ονομάζονται βιοϋμένια (βιομεμβράνες). Στο βιοϋμένιο, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πολυκύτταρα συσσωματώματα (μικροαποικίες σχήματος υψώματος-μανιταριού) έγκλειστα μέσα σε ένα βλεννώδες πλέγμα αποτελούμενο από πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, και πολυσακχαρίτες που παράγονται από τα ίδια τα βακτήρια.

Ο Claude Zobell σημείωσε για πρώτη φορά την προτίμηση των θαλάσσιων βακτηρίων να αναπτύσσονται σε επιφάνειες (Zobel, 1943), και οι Costerton et al., 1999, επέκτειναν αυτή την παρατήρηση σε συστήματα του γλυκού νερού και σε μία ποικιλία μικροβιακών οικοσυστημάτων, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων στις επιφάνειες των ευκαρυωτικών ιστών. 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, αλλά η γενική θεωρία του βιοϋμενίου δεν διαδόθηκε μέχρι το 1978 (Costerton et al., 1978). Τη δεκαετία του 1980, έγινε αντιληπτό το βιοϋμένιο (και απεικονίζεται) διαπιστώνοντας ότι οι μικροοργανισμοί που προσκολλώνται σε επιφάνειες, αβιοτικές και μη, βρίσκονται οργανωμένοι σε μια πολύπλοκη μορφή συμβίωσης, ενώ το αρχικό ερώτημα που τέθηκε ήταν μέχρι πόσο βαθιά στα κύτταρα του βιοϋμενίου φτάνουν τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο. Αυτό το καίριο ερώτημα απαντήθηκε και ξεκίνησε η σύγχρονη εποχή του βιοϋμενίου, όταν οι πρώτες εικόνες βιοϋμενίου (Lawrence et al., 1991) έδειξαν ότι τα βακτήρια αναπτύσσονται σε μικροαποικίες που περικλείονται από ένα βλεννώδες πλέγμα, διάσπαρτα ανάμεσα σε ανοικτά κανάλια νερού.

Σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά (μη-προσκολλημένα) κύτταρα, οι συμπαγείς μικροβιακές κοινοπραξίες που υπάρχουν στο βιοϋμένιο παρουσιάζουν εξαιρετική αντοχή στα συνηθισμένα βιοκτόνα, στις αντιμικροβιακές θεραπείες και στις ανοσολογικές αποκρίσεις άμυνας του ξενιστή. Η διαλεύκανση της παθοφυσιολογίας του βακτηριακού βιοϋμενίου έχει σημαντική κλινική σημασία, αφού το βιοϋμένιο αντιπροσωπεύει πάνω από το 80% των μικροβιακών μολύνσεων στο ανθρώπινο σώμα (Davies, 2003). Σε ένα βιοϋμένιο, οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μέχρι και 1000 φορές πιο ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά από ό,τι τα πλαγκτονικά βακτήρια, ενώ μπορούν πιο αποτελεσματικά να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Fux et al., 2005), καθιστώντας εξαιρετικά δύσκολη την εξάλειψή τους. Επίσης, οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτό το δίκτυο παρουσιάζονται πιο ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Lewis, 2005).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε από νωρίς, 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. Ενώ, έχουν βρεθεί παθογόνα στελέχη βακτηρίων να διαβιούν για μεγάλες χρονικές περιόδους στο νερό, στο έδαφος, στην επιφάνεια φυτών και επίσης έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν βιοϋμένια σε φυτικούς ιστούς καθώς έτσι 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).

Ακόμα, ο ρυθμός της βακτηριακής ανάπτυξης επηρεάζεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα που συμμετέχουν σε ένα βιοϋμένιο περιορίζονται σε ένα περιορισμένο χώρο (Stewart and Franklin, 2008), με

αποτέλεσμα η κατάσταση ανάπτυξης τους να είναι παρόμοια με τη στατική φάση που δημιουργείται σε συνθήκες εργαστηρίου. Κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης, τα βακτήρια αλλάζουν ριζικά τη φυσιολογία τους, αυξάνοντας την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τα αντιβιοτικά, οι χρωστικές, και άλλα μικρά μόρια (Martin and Liras, 1989). Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες επίσης λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία του σχηματισμού βιοϋμενίου ή να ανασταλλεί ο σχηματισμός βιοϋμενίου από άλλους οργανισμούς που ζουν στο ίδιο ενδιαίτημα (Lopez and Kolter, 2009).

Τα πλανκτονικά κύτταρα, από τα κύτταρα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του βιοϋμενίου, διαφέρουν ως προς τη φυσιολογία και τη μορφολογία (Antoniani et al., 2009). Ενώ, συχνά και εντός του βιοϋμενίου προκύπτουν εξειδικευμένοι τύποι κυττάρων λόγω των διαφορών στη γονιδιακή έκφραση (Fux et al., 2005). Η κυτταρική διαφοροποίηση σε βακτηριακές κοινότητες εξαρτάται από τις συνθήκες των εξωκυττάρων συνθηκών στις οποίες εκτίθενται τα κύτταρα. Ο σχηματισμός διαβαθμίσεων της συγκέντρωσης των θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου ή αποδεκτών ηλεκτρονίων σε όλο το βιοϋμένιο δημιουργεί μικροπεριβάλλοντα στα οποία τα κύτταρα αποκρίνονται με μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων τους (Stewart και Franklin, 2008).

Τα βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν τόσο από ένα γένος βακτηρίων όσο και να αποτελούνται από έναν ετερογενή βακτηριακό πληθυσμό (Donlan, 2002; Stoodley et al., 2002). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου έχει μελετηθεί εκτενώς στα βακτήρια *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, και *S. marcescens* (Davey and O'Toole, 2000), ενώ έντονη 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). Τέλος, ικανοί μικροοργανισμοί για πρόκληση λοιμώξεων είναι οι *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus epidermidis* και τα εντεροβακτήρια.

### **A.3.2.2 Στάδια ανάπτυξης**

Έχει προταθεί ένα κοινό μοντέλο που περιγράφει το σχηματισμό ενός διαφοροποιημένου και ώριμου βακτηριακού βιοϋμενίου, το οποίο περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε αναπτυξιακά στάδια (Van Houdt and Michiels, 2005).

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

Η δημιουργία του βιοϋμενίου ξεκινάει με την προσκόλληση των πλανκτονικών βακτηριακών κυττάρων σε μια επιφάνεια. Η αρχική προσκόλληση είναι αναστρέψιμη, επιτελείται μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, ασθενών δυνάμεων Van der Waals και δυνάμεων διάτμησης μεταξύ του κυτταρικού φακέλου και της επιφάνειας προσκόλλησης και διευκολύνεται από την έκκριση μιας εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας.

Η αναστρέψιμη προσκόλληση των κυττάρων σε μια επιφάνεια εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς, τα επίπεδα θρεπτικών συστατικών και τα δομικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Μάλιστα μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι μικροοργανισμοί αποδίδουν ταχύτερα σε υδρόφοβες, μη πολικές επιφάνειες όπως τα πλαστικά, παρά σε υδρόφιλα υλικά, όπως το γυαλί ή τα μέταλλα (Dunne, 2002).

## Στάδιο 2<sup>ο</sup>: Μη αναστρέψιμη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνεια.

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:** Αποτελούν πρωτεϊνικής φύσης νηματοειδείς προσκολλητίνες (*filamentous proteinaceous adhesins*), που εκφράζονται από παθογόνα και μη στελέχη του βακτηρίου *E. coli*, όπως και από άλλα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Sauer et al. 2000). Η διάμετρος των κροσσών είναι 5-7 nm ενώ το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 0.2 και 2 μm και τα βακτήρια που εκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες, διαθέτουν στη μεμβράνη τους περίπου 100 έως 500 κροσσούς. Το σύμπλεγμα *fim* γονιδίων κωδικοποιεί τα δομικά συστατικά του κροσσώτου οργανιδίου καθώς και τη βιοσυνθετική μηχανή των κροσσών και τα ρυθμιστικά στοιχεία τους. Το σύμπλεγμα *fim* γονιδίων τοποθετείται ανοδικά του *fimA* γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για την κύρια υπομονάδα κροσσίνης, και αποτελεί ένα θραύσμα DNA που περιέχει τον υποκινητή των *fim* γονιδίων, ο οποίος υποβάλλεται σε ένα σύστημα ελέγχου τύπου flip-flop, δημιουργώντας μια μεταβλητή φάση έκφρασης των κροσσών τύπου 1 (Olsen and Klemm, 1994). Αυτό το σύστημα ελέγχου έκφρασης καταλύεται από δύο ανασυνδιάσες τις FimE και FimB οι οποίες προωθούν την εναλλαγή έκφρασης ή μη-έκφρασης και ένα πλήθος καθολικών ρυθμιστών όπως είναι η ρυθμιστική πρωτεΐνη Lrp, ο παράγοντας ενσωμάτωσης ξενιστή IHF και η πυρηνοειδής πρωτεΐνη H-NS (Van Houdt and Michiels, 2005). Τα στελέχη του *E. coli* που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων *fimA* και *fimH*, 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:** Οι αμυλοειδείς κροσσοί είναι ετεροπολυμερείς πρωτεϊνούχες νηματοειδείς αποφύσεις οι οποίες αποτελούνται από μια μεγάλη (*CsgA*) και μια μικρή (*CsgB*) υπομονάδα και επηρεάζουν τις ιδιότητες προσκόλλησης αρκετών στελεχών *E. coli* όπως και άλλων γενών της οικογένειας των εντεροβακτηρίων όπως τα γένη *Shigella*, *Citrobacter* και *Enterobacter* (Olsen et al., 1989; 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). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των κροσσών οργανώνονται σε δύο οπερόνια, το *csgBA* που κωδικοποιεί για τα δομικά στοιχεία που συνθέτουν τον αμυλοειδή κροσσό και το *csgDEFG* που κωδικοποιεί για το σύστημα *CsgE-G* και για το μεταγραφικό παράγοντα *CsgD* ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *LuxR* και απαιτείται για τη μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου *csgBA* (Hammar et al., 1995). Παρόλο που αυτά τα οπερόνια είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των *E. coli* στελεχών, πολλά εργαστηριακά στελέχη δεν παράγουν αμυλοειδείς κροσσούς λόγω της σίγησης του υποκινητή *csgD* (Hammar et al., 1995), του οποίου η έκφραση επηρεάζεται από διάφορους ρυθμιστές της μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένων των IHF, H-NS, *OmpR* και *CpxR* (Haagmans and van der Woude, 2000). Η πρωτεΐνη *OmpR* είναι ο ρυθμιστής απόκρισης του συστήματος μεταγωγής σήματος δύο συστατικών *OmpR/EnvZ*, το οποίο αποκρίνεται στην εξωτερική ωσμωτικότητα. Η έκφραση των αμυλοειδών κροσσών επηρεάζεται επίσης από το σύστημα μεταγωγής σήματος δύο συστατικών *CpxRA*,

όπου η CpxR ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των κροσσών μετά από ειδική πρόσδεση στους υποκινητές *csgD* και *csgB* (Prigent-Combaret et al., 2001).

Στο βακτήριο *S. typhimurium*, ο κύριος ρυθμιστής CsgD, ρυθμίζει θετικά την παραγωγή των αμυλοειδών κροσσών και του εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη κυτταρίνη, τα οποία αποτελούν συστατικά του πλέγματος του βιοϋμενίου. Ο ρυθμιστής CsgD ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *Adra* που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη η οποία περιέχει έναν τομέα GGDEF και διεγείρει τη βιοσύνθεση της κυτταρίνης και την ενίσχυση της έκφρασης των αμυλοειδών κροσσών, μέσω της παραγωγής c-di-GMP (Kader et al., 2006).

**Συζευκτικά τριχίδια:** Η βακτηριακή σύζευξη είναι μια διαδικασία οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων η οποία περιλαμβάνει στενή επαφή των κυττάρων, κύτταρο-προς-κύτταρο, όπου ένα συζευκτικό πλασμιδίο μεταδίδεται από ένα κύτταρο δότη σε ένα κύτταρο δέκτη μέσω εξειδικευμένου συζευκτικού τριχιδίου που κωδικοποιείται επί του πλασμιδίου. Έχει βρεθεί ότι η εισαγωγή πλασμιδίου σύζευξης, τεχνητά ή φυσικά, σε μεικτές καλλιέργειες *E. coli*, συμβάλλει στην αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου αφού τα συζευκτικά τριχίδια δρουν ως παράγοντες συγκόλλησης, επιτρέποντας μη-ειδική προσκόλληση σε στέρεη επιφάνεια ή επαφές κυττάρου-κύτταρου και έτσι επιταχύνεται η αρχική προσκόλληση στην αβιοτική επιφάνεια καθώς και η υποστήριξη της τρισδιάστατης ανάπτυξης του βιοϋμενίου (Ghigo, 2001). Ενώ, αποδείχθηκε ότι τα F-συζευκτικά τριχίδια (*F conjugative pilus*) μπορούσαν να συμπληρώσουν τη δράση των υπόλοιπων παραγόντων προσκόλλησης όπως των τριχιδίων τύπου 1, του Ag43 ή των αμυλοειδών κροσσών (Reisner et al., 2003).

Ακόμα, σε αυτό το στάδιο, πρωτεΐνες της επιφάνειας των βακτηρίων όπως η SadB ή Lara και τα εξωπολυσακχαρίδια (EPS) βοηθούν τη συγκόλληση μεταξύ του κυττάρου και της επιφάνειας. Κατά τη μετάβαση σε μη αναστρέψιμη προσκόλληση, εμπλέκεται το c-di-GMP, το οποίο παράγεται από πολλά βακτήρια και ρυθμίζει την παραγωγή και την κινητικότητα των EPS σε αντίθετες κατευθύνσεις. Επίσης, στη μετάβαση από αναστρέψιμη σε μη αναστρέψιμη προσκόλληση συμμετέχει και το cAMP (Ono et al., 2014), ενώ οι συγκεντρώσεις και των δύο ελέγχονται από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι η συγκέντρωση άνθρακα και οξυγόνου (McDonough and Rodriguez, 2012).

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

Μετά τη μη αναστρέψιμη προσκόλληση, τα βακτηριακά κύτταρα αρχίζουν να αναπτύσσονται σε μικροαποικίες. Ο σχηματισμός των μικροαποικιών αρχίζει με την έκφραση των IV τριχιδίων (Type IV pili). Στο βακτήριο *P. aeruginosa*, τα IV τριχίδια, σχετίζονται με την κινητικότητα των κυττάρων, που επιτελούν έναν συγκεκριμένο τύπο κίνησης, το τίναγμα (*twitching*). Αυτή η ιδιότητα 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) (O'Toole and Kolter, 1998).

Επίσης, το αντιγόνο 43 καθορίζει την αυτόματη συσσωμάτωση των κυττάρων μέσω Ag43- Ag43 αλληλεπιδράσεων και προάγει το σχηματισμό βακτηριακού βιοϋμενίου μέσω επαγωγής του σχηματισμού μικροαποικιών (Kjaergaard et al., 2000). Το αντιγόνο 43 (Ag43) είναι μία εξέχουσα επιφανειακή πρωτεΐνη του *E. coli* (~50.000 αντίτυπα ανά κύτταρο) και είναι το προϊόν του γονιδίου *agn43* (ονομάζεται επίσης *flu*). Αυτή η πρωτεΐνη αυτομεταφορέας είναι μια προσκολλητίνη αυτο-αναγνώρισης,

η οποία περιέχει τόσο την αναγνώριση του υποδοχέα όσο και του υποδοχέα στόχου και προεξέχει περίπου 10 nm πέρα από την εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου (Klemm et al., 2004).

#### **Στάδιο 4<sup>ο</sup>: Σχηματισμός του ώριμου τρισδιάστατου βιοϋμενίου.**

Η επόμενη φάση της ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου, η ωρίμανση, οδηγεί σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, μεταφορά γενετικής πληροφορίας και στη δημιουργία μίας εξωκυττάριας δομής ή ενός πλέγματος (*biofilm matrix*), που συνθέτει την αρχιτεκτονική ενός βιοϋμενίου. Ουσιαστικά, σε αυτό το στάδιο το βιοϋμένιο αποτελείται από μικροαποικίες οι οποίες περιβάλλονται από το πλέγμα και διαχωρίζονται με ανοιχτά κανάλια, μέσω των οποίων ρέει το υγρό, το οποίο μεταφέρει σηματοδοτικά μόρια, θρεπτικές ουσίες στα κύτταρα και απομακρύνει τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού (Cho et al., 2007).

Στα περισσότερα ώριμα βιοϋμένια, το πλέγμα αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% της ξηράς μάζας (10% βακτήρια ενώ το 97% της ολικής μάζας είναι νερό), ενώ τα συστατικά του περιλαμβάνουν EPS, νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια, εξωκυτταρικό DNA (eDNA) και άλλα βιοπολυμερή. Στο βιοϋμένιο, τα EPS είναι υπεύθυνα για την πρόσφυση σε επιφάνειες και διατηρούν την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του βιοϋμενίου. Το πλέγμα περιβάλλει το βιοϋμένιο προστατεύοντας τα βακτηριακά κύτταρα έναντι διαφόρων ουσιών όπως αντιβιοτικά, ανοσοποιητική απόκριση ξενιστή, οξειδωση. Επίσης, το πλέγμα διατηρεί τα μόρια σηματοδότησης του QS μηχανισμού, τα εξωκυττάρια ένζυμα και τα μεταβολικά προϊόντα (Flemming and Wingender, 2010).

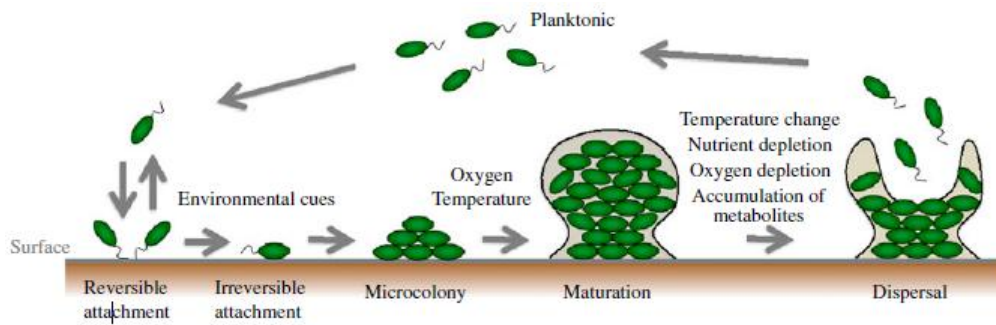
Τέλος, το πλέγμα συσσωρεύει απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, εξωπολυσακχαριδία όπως η κυτταρίνη, το PGA (πολυσακχαρίτης beta-1,6-GlcNAc ή poly-GlcNAc), το κολανικό οξύ και καθώς τα βακτήρια βρίσκονται σε αρκετά κοντινή απόσταση μεταξύ τους, επιτρέπεται ευκολότερα η διακίνηση τους, για την ευνοϊκότερη ανάπτυξή τους (Davey and O'Toole, 2000; Flemming and Wingender, 2010).

#### **Στάδιο 5<sup>ο</sup>: Αποκόλληση και διασπορά κυττάρων από το βιοϋμένιο και απαρχή νέου βιοϋμενίου.**

Από το ώριμο βιοϋμένιο κάποια κύτταρα αποκολλώνται, υοθετούν το πλαγκτονικό στάδιο ανάπτυξης και διασπείρονται ώστε να αναζητήσουν και να προσκολληθούν σε μια νέα επιφάνεια. Έτσι, η διασπορά δεν είναι μόνο το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής ενός βιοϋμενίου, αλλά και η έναρξη σχηματισμού ενός καινούριου (Εικόνα.Α.3.5).

Υπάρχει η «ενεργός διασπορά», η οποία εξαρτάται από την κινητικότητα των κυττάρων ή την αποικοδόμηση των EPS και η «παθητική διασπορά», η οποία εξαρτάται από φυσικούς παράγοντες όπως η δύναμη διάτμησης υπό συνθήκες ροής υγρού. Η «ενεργός διασπορά» ενεργοποιείται από τις αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η αλλαγή της θερμοκρασίας, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η έλλειψη οξυγόνου και η συσσώρευση μεταβολιτών. Στην «ενεργό διασπορά», τα γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική κινητικότητα, όπως η σύνθεση μαστιγίων ή ο χημειοτακτισμός και στην αποικοδόμηση των EPS, ρυθμίζονται θετικά, ενώ τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή των EPS, όπως σύνθεση πολυσακχαριτών, και στην προσκόλληση, όπως σύνθεση κροσσών, ρυθμίζονται αρνητικά. Το c-di-GMP εμπλέκεται ενεργά σε αυτή τη ρύθμιση των γονιδίων (McDougald et al., 2012).

Ο μικροοργανισμός *Bacillus subtilis* για την αποκόλληση και διασπορά του βιοϋμενίου, απελευθερώνει D-αμινοξέα, 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, που καταλύουν τη στερεοχημική μετατροπή των l-αμινοξέων σε d-αμινοξέα.



**Εικόνα A3.5.:** Τα στάδια ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου (Toyofuku et al., 2015).

### A.3.2.3 Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϋμενίου

Πρωτομική μελέτη στα κύτταρα ώριμου βιοϋμενίου του βακτηρίου *P. aeruginosa* έδειξε ότι έχουν ριζικά διαφορετικό πρωτεϊνικό προφίλ από αυτό των πλαγκτονικών κυττάρων. Το 50% των ανιχνεύσιμων πρωτεϊνών (πάνω από 800 πρωτεΐνες) αποδείχθηκε ότι παρουσιάζει έξι φορές ή και μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση. Από αυτές, περισσότερες από 300 πρωτεΐνες ήταν ανιχνεύσιμες σε δείγματα ώριμης βιομεμβράνης ενώ ήταν μη ανιχνεύσιμες σε πλαγκτονικά βακτηριακά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν αφορούν το μεταβολισμό, τα φωσφολιπίδια και την LPS-βιοσύνθεση, την έκκριση και τη μεταφορά στη μεμβράνη καθώς και την προσαρμογή και τους προστατευτικούς μηχανισμούς (Sauer et al. 2000). Αντίστοιχα αποτελέσματα υπέδειξε και άλλη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA για την αξιολόγηση του ώριμου βιοϋμενίου σε σύγκριση με τις υγρές καλλιέργειες του *P. aeruginosa*. Σύμφωνα με αυτήν, 70 γονίδια παρουσίασαν μεταβολές στην έκφραση και μεταξύ αυτών των γονιδίων ανιχνεύθηκαν να αυξάνεται η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετάφραση, το μεταβολισμό, τη μεταφορά και/ή την έκκριση πρωτεϊνών στη μεμβράνη και τη ρύθμιση γονιδίων (Whiteley et al., 2001).

Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του μικροοργανισμού *B. subtilis* χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχιές RNA, προερχόμενο τόσο από κύτταρα βιοϋμενίου κατά την πορεία σχηματισμού του (8, 12 και 24 ώρες) όσο και από πλαγκτονικά κύτταρα, υπέδειξε ένα σύνολο 519 γονιδίων τα οποία εκφράζονται διαφορετικά κατά τη χρονική πορεία σχηματισμού του βιοϋμενίου. Πάνω από το 55% αυτών των γονιδίων εκφράστηκε μόνο σε ένα από τα τρία χρονικά σημεία, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει χρονικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια σχηματισμού του βιοϋμενίου. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με τη μεμβράνη, τη γλυκόλυση και τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, ενώ επιπλέον υπήρχαν πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην κινητικότητα και στο χημειοτακτισμό (Stanley et al., 2003).

#### A.3.2.3.1 Γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli*

Η μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων του στελέχους *E. coli* K-12 υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου μελετήθηκε με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA. Διαπιστώθηκε ότι το 10% των γονιδίων εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, σε σύγκριση με την εκθετική φάση ανάπτυξης του

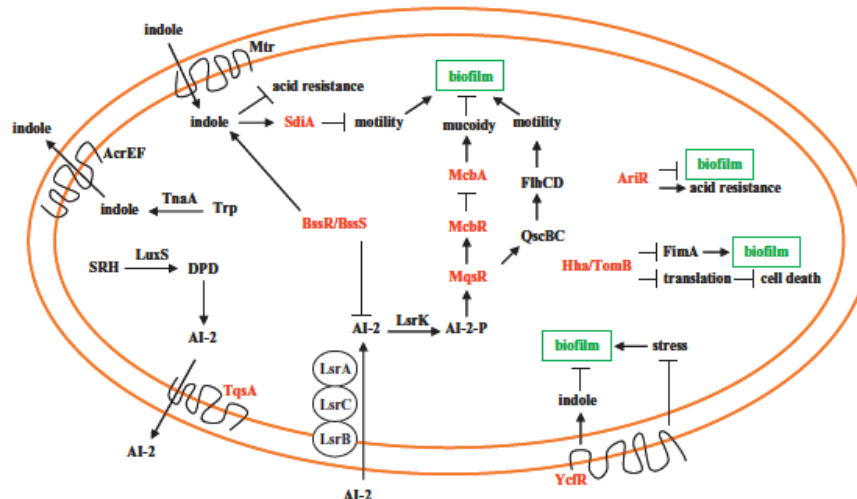
βακτηρίου σε υγρή καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, 26 γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη μεταγραφή, μετάφραση και αντιγραφή του DNA, 45 γονίδια συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, στη μεταφορά ανόργανων ιόντων, στη βιοσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και στην έκκριση, στην κυτταρική 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).

Κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, βρέθηκε ότι επάγονται οι μεταγραφικοί παράγοντες *cspABFGI* (cold-shock) και ο μεταγραφικός παράγοντας *htgA* (heat-shock), ενώ μεταβλήθηκαν και έξι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το βακτηριακό μόριο σηματοδότησης, το c-di-GMP, οι *yaiC*, *yliF*, *yciR*, *yddV*, *yeaJ* και *yjiU* (Domka et al., 2007). Από αυτές, η *YciR* έχει συνδεθεί με τον μεταγραφικό ρυθμιστή H-NS και την έκφραση των κροσσών μέσω c-di-GMP ελέγχου της στατικής φάσης, της αντίδρασης στο στρες και του κύριου ελεγκτή *RpoS* ενώ και η *YaiC* έχει συνδεθεί με την έκφραση των κροσσών και την κυτταρίνη μέσω του c-di-GMP (Weber et al., 2006). Επιπλέον, η πρωτεΐνη *RpoS* διαδραματίζει βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια σχηματισμού του βιοϋμενίου επειδή κωδικοποιεί τον παράγοντα σίγμα  $\sigma^S$ , ο οποίος ρυθμίζει έναν αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με το στρες και το γονίδιο *yeaGH* ταυτοποιήθηκε επίσης ως υποθετικό γονίδιο απόκρισης στο στρες, το οποίο ρυθμίζεται από τον *RpoS* στο βακτήριο *Salmonella enterica* (Schembri et al., 2003).

Επίσης, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου του *E. coli*, παρατηρήθηκε ότι επάγονται τα γονίδια *cspAGH*, *ibpAB*, *rphA*, *soxS*, και *yfiD* (Hancock and Klemm, 2007), ενώ στο παθογόνο *E. coli* στέλεχος βρέθηκε ότι επάγεται η έκφραση πολλών γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης όπως η *YaeT*, ή *BamA*, ένα συντηρημένο μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών *YaeT/Omp85*, οι οποίες απαιτούνται για τη βιογένεση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs). Επίσης, τα γονίδια *YceP* (*BssS*) και *YliH* (*BssR*) ρυθμίζουν την παραγωγή της ινδόλης και την πρόσληψη και εξαγωγή του αυτοεπαγωγέα AI-2 (Da Re et al., 2013). Ακόμα, το συμπλέγμα γονιδίων *ymgABC* παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό βιοϋμενίου του *E. coli* και στην ανοχή σε στρες λόγω χαμηλού pH, ως αποτέλεσμα του αυτοεπαγωγέα AI-2 ή της σηματοδότησης μέσω ινδόλης (Lee et al., 2007a). Πρόσφατη μελέτη υπέδειξε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *YmdB* (που κωδικοποιείται από το συμπλέγμα γονιδίων *ymgABC*, αναστέλλει το σχηματισμό βιοϋμενίου στο *E. coli* (Kim et al., 2013).

Τέλος, η πρωτεΐνη *SdiA* (Regulatory protein) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του βιοϋμενίου, καθώς αναγνωρίζει λακτόνες άκυλο-ομοσερίνης (AHL) άλλων βακτηρίων. Δηλαδή το *E. coli* μέσω της *SdiA* μπορεί να αναγνωρίσει σήματα που το ίδιο δεν συνθέτει (van Houdt et al., 2006).





**Εικόνα Α3.6.:** Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη δημιουργία βιοϋμενίου στο βακτήριο *E. coli*. (Wood, 2009).

#### A.3.2.4 Το c-di-GMP κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ της ομαδικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου

Η σχέση μεταξύ της κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου τείνει να είναι πολύπλοκη, γιατί και οι δύο διαδικασίες περιλαμβάνουν παρόμοιους μηχανισμούς σε ορισμένα στάδια και ειδικές συνθήκες. Για παράδειγμα, η έναρξη σχηματισμού ενός βιοϋμενίου στο στάδιο της αναστρέψιμης προσκόλλησης απαιτεί τη συμμετοχή των μαστιγίων, αφού η κινητικότητα σε μια επιφάνεια μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την αρχιτεκτονική του βιοϋμενίου. Ωστόσο, η κινητικότητα εμπλέκεται επίσης και στην απελευθέρωση των βακτηρίων από ώριμα βιοϋμένια (O'Toole and Kolter, 1998). Παρ'όλα αυτά, τα βακτήρια σε ορισμένα στάδια μπορούν να επιλέξουν μεταξύ της κινητικότητας, όπως είναι η ομαδική κίνηση, και του σχηματισμού βιοϋμενίου.

Έχει καταστεί σαφές ότι το βακτηριακό μόριο ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, το c-di-GMP λειτουργεί ως ένας δεύτερος αγγελιαφόρος σε απόκριση στα εξωκυττάρια σήματα και ρυθμίζει τη βακτηριακή συμπεριφορά, την κινητικότητα και τη μολυσματικότητα σε πολλά διαφορετικά βακτήρια. γενικά οι υψηλές συγκεντρώσεις του c-di-GMP συσχετίζονται με αυξημένη προσκόλληση και μειωμένη κινητικότητα και μολυσματικότητα. Πολλοί οργανισμοί έχουν πολλαπλές πρωτεΐνες με GGDEF ή EAL περιοχές (κυκλάσες ή φωσφοδιεστεράσες αντίστοιχα) και πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν μια σπονδυλωτή δομή με περιπλασματική ή κυτταροπλασματική αισθητήρια μονάδα και έτσι τα περιβαλλοντικά και φυσιολογικά σήματα ρυθμίζουν τη δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών και καθορίζουν χρονικά τα κυτταρικά επίπεδα c-di-GMP (Verstraeten et al., 2008).

Στο βακτήριο *S. typhimurium*, ο κύριος ρυθμιστής CsgD, ρυθμίζει θετικά την παραγωγή των αμυλοειδών κροσσών και των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών, ενώ η ίδια η έκφραση του ρυθμιστή CsgD ελέγχεται (είτε θετικά είτε αρνητικά) από τουλάχιστον έξι GGDEF ή/και EAL πρωτεΐνες στο μεταγραφικό και μετά-μεταγραφικό επίπεδο. Διαφορετικές GGDEF ή/και EAL πρωτεΐνες έχουν σαφώς διακριτά καθήκοντα. Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη YhjH που διαθέτει τομέα EAL μειώνει την ομαδική και κολυμβητική κίνηση, αλλά δεν επηρεάζει το σχηματισμό βιοϋμενίου. Η δράση της YhjH ανταγωνίζεται από τον τομέα Pilz της πρωτεΐνης YcgR ενώ

και οι δύο πρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες των μαστιγίων κατηγορίας III. Έχει προταθεί ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο τα επίπεδα c-di-GMP ανιχνεύονται από την YcgR. Αυξημένα επίπεδα στη συνέχεια οδηγούν στην αναστολή της σωστή συναρμολότητας του μαστιγίου και ως εκ τούτου επηρεάζουν την κινητικότητα (Wolfe and Visick, 2008).

Στο βακτήριο *V. parahaemolyticus* έχουν εντοπιστεί δύο γενετικοί τόποι οι scrABC και scrG, όπου η υπερέκφραση τους μειώνει την έκφραση του γονιδίου *cps* και οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων και μειωμένο σχηματισμό βιοϋμενίου αλλά δεν επηρεάζει την ικανότητα κολυμβητικής κίνησης. Τόσο το γονίδιο scrC όσο και το scrG κωδικοποιούν για GGDEF-EAL πρωτεΐνες και πιθανώς λειτουργούν στην ίδια ρυθμιστική οδό και εμπλέκονται στον έλεγχο των κυτταρικών επιπέδων του c-di-GMP. Οι scrC και scrG λειτουργούν κυρίως ως φωσφοδιεστεράσες. Μειωμένα επίπεδα του c-di-GMP οδηγούν στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *LAF* και την αύξηση της ικανότητας ομαδικής κίνησης, ενώ αναστέλλουν την έκφραση του *cps* και το σχηματισμό βιοϋμενίου (Kim and McCarter, 2007).

Οι πρωτεΐνες SadC, Bifa και SadB ρυθμίζουν την κινητικότητα και το σχηματισμό βιοϋμενίου στο *P. aeruginosa PA14*. Η κυκλάση SadC, που εντοπίζεται στη μεμβράνη, παράγει c-di-GMP ως απόκριση σε ένα άγνωστο σήμα, ίσως την επαφή με μια επιφάνεια ή αλλαγές στο ιξώδες του μέσου. Η ποσότητα αυτού του μοριακού σήματος μπορεί να μειωθεί με τη φωσφοδιεστεράση Bifa, παρέχοντας ένα δεύτερο σημείο ελέγχου, με το οποίο ρυθμίζονται τα επίπεδα c-di-GMP. Αυτό το σήμα c-di-GMP, μεταδίδεται κατόπιν, ίσως μέσω της SadB, στα γονίδια *pel* ή /και σε γονίδια του CheIV συμπλέγματος του χημειοτακτισμού, το οποίο οδηγεί στον έλεγχο της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών και της λειτουργίας των μαστιγίων. Οι *pel* και *psl* γενετικοί τόποι εμπλέκονται στην παραγωγή του πολυσακχαρίτη, συστατικού του πλέγματος που απαιτείται για την ωρίμανση του βιοϋμενίου στο βακτήριο *P. aeruginosa*. Κατά συνέπεια, το c-di-GMP μέσω της SadB μπορεί να ελέγξει τη μετάβαση από το βιοϋμένιο στην ομαδική κίνηση με διαμόρφωση των μαστιγίων (Kuchma et al., 2007).

#### **A.3.2.5 Ο ρόλος των πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομερασών στην ομαδική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου**

Η μελέτη φαινοτυπικού χαρακτηρισμού στελεχών του μικροοργανισμού *E. coli* που έχει αναφερθεί παραπάνω (A.3.1.5), σύμφωνα με την οποία στελέχη που φέρουν μοναδική απαλοιφή για 3.985 γονίδια χαρακτηρίστηκαν σε συνθήκες ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια, υπέδειξε ότι ανάμεσα στα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα, βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν και για τσαπερόνες ή για πρωτεΐνες αναδίπλωσης πρωτεϊνών όπως οι PPIάσες (Inoue et al., 2007). Όπως περιγράφεται στην έρευνα, τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διαδικασιών, ως εκ τούτου, είναι λογικό να αναμένει κανείς ότι συνοδοί πρωτεΐνες και πρωτεΐνες αναδίπλωσης πρωτεϊνών απαιτούνται για τη σωστή αναδίπλωση και αποικοδόμηση πολλών πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με την ομαδική κίνηση. Επομένως, ο ρόλος των PPIάσων στην ομαδική κίνηση σε επιφάνεια είναι σύνθετος, έμμεσος και πιθανότατα προκύπτει μέσω της αναδίπλωσης ή μέσω της *cis/trans* ισομερίωσης πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτήν (Inoue et al., 2007).

Παρόμοια, μελέτη στην οποία χαρακτηρίστηκαν τα ίδια μεταλλαγμένα στελέχη του *E. coli* αυτή τη φορά για την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοϋμένιο, κατέδειξε ότι οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) συμμετέχουν στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Η παρβουλίνη SurA, είναι γνωστό ότι συμβάλλει στη βιοσύνθεση των OMPs. Το στέλεχος που φέρει απαλοιφή του γονιδίου *surA* παρουσιάζει

μειωμένα επίπεδα των OMPs και επομένως απώλεσε την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Niba et al., 2007).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλες μελέτες που συσχετίζουν την ομαδική κίνηση και το σχηματισμό βιοϋμενίου με τις ΡΡΐάσεις. Συγκεκριμένα, στο βακτήριο *Streptococcus mutants* που σχηματίζει βιοϋμενίο και είναι σημαντικός παράγοντας της οδοντικής πλάκας, βρέθηκε ότι το γονίδιο *ropA*, ομόλογο του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη ΡΡΐάση *tig* του *E. coli*, εμπλέκεται στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων και στο σχηματισμό του βιοϋμενίου. Απώλεια του γονιδίου *ropA* μείωσε την ικανότητα του *S. mutants* για να σχηματισμό βιοϋμενίου πάνω από 80%, όταν καλλιεργούταν σε γλυκόζη, αλλά αύξησε το σχηματισμό βιοϋμενίου πάνω από 50% όταν χορηγήθηκε σακχαρόζη ως πηγή υδατάνθρακα (Wen et al., 2005).

Τέλος, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη BPSS1823 του παθογόνου μικροοργανισμού *Burkholderia pseudomallei*, αποτελεί έναν από τους λοιμογόνους παράγοντες του. Η BPSS1823 ανήκει στην οικογένεια των Mips πρωτεϊνών, μια ομάδα λοιμογόνων παραγόντων που κωδικοποιούνται από παθογόνα βακτήρια όπως τα *Legionella*, *Chlamydia* και τα είδη *Neisseria* και αποτελούν μέρος της οικογένειας των FKBP. Απενεργοποίηση λοιπόν του γονιδίου *BPSS1823* προκάλεσε, μεταξύ άλλων, μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης (Norville et al., 2011).

#### **A.4 Κυτταρική Διαίρεση των βακτηρίων**

Η επιβίωση οποιουδήποτε κυτταρικού οργανισμού βασίζεται στον αποτελεσματικό συντονισμό της αντιγραφής του χρωμοσώματος με την κυτταρική διαίρεση για την παραγωγή βιώσιμων θυγατρικών κυττάρων. Η σειρά των διακριτών γεγονότων της κυτταρικής ανάπτυξης, η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων, ο αποχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η κυτταροκίνηση (κυτταρική διαίρεση) είναι θεμελιώδους σημασίας για τον κυτταρικό κύκλο σε ενεργά διαιρούμενα ευκαρυωτικά κύτταρα και εμφανίζεται μέσω των σημείων ελέγχου που εξασφαλίζουν την ολοκλήρωση της προηγούμενης διαδικασίας πριν από την έναρξη μιας επόμενης. Ωστόσο, στον κυτταρικό κύκλο των βακτηρίων, η διαίρεση υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών ή υπό συνθήκες υψηλής ανάπτυξης, τα γεγονότα της κυτταρικής ανάπτυξης, αντιγραφή του χρωμοσώματος, αποχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η συναρμολόγηση του μηχανισμού της διαίρεσης στο σημείο της διαίρεσης, συμβαίνουν ταυτόχρονα. Το χρωμόσωμα αρχίζει έναν επόμενο κύκλο αντιγραφής πριν από την ολοκλήρωση του πρώτου, ένας μηχανισμός που ονομάζεται πολυδιχαλωτή αντιγραφή. Όσο η διαδικασία της αντιγραφής πλησιάζει στην ολοκλήρωση, οι πρωτεΐνες που αποτελούν το μηχανισμό της διαίρεσης συσσωρεύονται στο χώρο της διαίρεσης στο πλαίσιο της προετοιμασίας για την διαφραγματοποίηση.

Η ταυτόχρονη φύση αυτών των γεγονότων στον κυτταρικό κύκλο των βακτηρίων αποτελεί αντικείμενο μελέτης λόγω της δυσκολίας του διαχωρισμού αυτών των διαδικασιών. Παρά την έντονη έρευνα επί αρκετές δεκαετίες, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα βακτήρια σχηματίζουν το διάφραγμα, χωρικά και χρονικά, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός.

##### **A.4.1 Η κυτταρική διαίρεση του μικροοργανισμού *E. coli***

Η βακτηριακή διαίρεση αρχίζει κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των βακτηριακών χρωμοσωμάτων που έχουν προκύψει από την αντιγραφή και τελειώνει με τον σχηματισμό δύο πανομοιότυπων θυγατρικών κυττάρων. Ο διαχωρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται με το σχηματισμό ενός

διαφράγματος που ακολουθείται από την υδρόλυση του συνεχούς διαφραγματικού στρώματος πεπτιδογλυκάνης (Egan and Vollmer, 2013). Στα Gram-αρνητικά βακτήρια η υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης λαμβάνει χώρα σταδιακά κατά τη διάρκεια της εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής και της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ τα θετικά κατά Gram-βακτήρια συνθέτουν πρώτα το πλήρες εγκάρσιο διάφραγμα και έπειτα υδρολύουν την πεπτιδογλυκάνη και έτσι διαχωρίζεται η κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελεί το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης (divisome) και ο σχηματισμός του διαφράγματος ελέγχονται χωρικά και χρονικά (Natale, 2013).

#### A.4.1.1 Ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου

Στα περισσότερα βακτήρια, η κύρια μακρομοριακή δομή που είναι υπεύθυνη για το συντονισμό της κυτταρικής διαίρεσης με τις άλλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αντιγραφής και του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, είναι ο Z-δακτύλιος (Lutkenhaus et al., 2012). Ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου αποτελεί το πρώτο βήμα στη βακτηριακή κυταροκίνηση. Ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου καθορίζει τη θέση της μελλοντικής κυτταρικής διαίρεσης και αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της χρονικής ρύθμισης της κυταροκίνησης. Μόλις ο Z-δακτύλιος έχει σχηματιστεί γίνεται ένα ικρίωμα για παραπάνω από 30 πρωτεΐνες που σχηματίζουν το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελεί το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης (Liu et al., 2015). Εκτός από τις 12 βασικές πρωτεΐνες, οι επιπλέον πρωτεΐνες που προσλαμβάνονται στο σύμπλοκο, αποτελούν βοηθητικές πρωτεΐνες για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του συμπλόκου ή ρυθμίζουν τη διαδικασία της διαφραγματοποίησης (Pichoff et al., 2015).

Η έναρξη της συναρμολόγησης ελέγχεται αυστηρά από την πρωτεΐνη FtsZ, τόσο χρονικά όσο και χωρικά ώστε να αποτραπεί ανώμαλη διαφραγματοποίηση. Ο Z-δακτύλιος οργανώνεται από τα γραμμικά FtsZ- πρωτοϊνίδια που στο βακτήριο *Escherichia coli* είναι συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη του κυταροπλάσματος από τις πρωτεΐνες FtsA και ZipA. Η συναρμολόγηση και η αποσυναρμολόγηση των πρωτοϊνιδίων μπορεί να συμβεί γρήγορα στη χρονική κλίμακα των δευτερολέπτων (Erickson et al., 2010). Αυτή η δυναμική φύση του Z-δακτυλίου τον καθιστά ευπαθή σε ρύθμιση από πολλούς πρωτεϊνικούς παράγοντες που μπορούν να ανατρέψουν την ισορροπία ανάμεσα στην συναρμολόγηση και την αποσυναρμολόγηση των ινιδίων (Männik and Bailey, 2015). Η FtsZ θεωρείται η προγονική ομόλογος των ευκαρυωτικών τουμπουλίνων (Nogales et al., 1998) και όπως η τουμπουλίνη, η FtsZ υποβάλλεται *in vitro* σε GTP-εξαρτώμενο πολυμερισμό, ενώ και για τις δύο η βασική μονάδα συναρμολόγησης είναι τα πρωτοϊνίδια, σε μια γραμμική διάταξη υπομονάδων κεφαλής-ουράς (Lutkenhaus, 2007). Επίσης, το αμινοτελικό της άκρο διαθέτει θέση δέσμευσης του GTP (Oliva et al., 2004). *In vitro* πειράματα αποδεικνύουν ότι παρουσία ιόντων GTP και ιόντων μαγνησίου, η FtsZ σχηματίζει πρωτοϊνίδια και δέσμες με ένα ευρύ φάσμα σχημάτων, καμπυλότητας και γεωμετρίας (Mingorance et al., 2010). Το ίδιο το μονομερές της FtsZ και οι διασυνδέσεις υπομονάδων εντός των πρωτοϊνιδίων είναι ευέλικτες επιτρέποντας στα FtsZ πρωτοϊνίδια να υιοθετήσουν διάφορες γωνίες κάμψης ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες (Natale P., 2013). Η υδρόλυση του GTP χρησιμοποιείται για τον ολιγομερισμό των μονομερών FtsZ κατά το σχηματισμό του δακτυλίου. Η συναρμολόγηση και η σταθεροποίηση των πολυμερών της FtsZ στο δακτύλιο ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες Zap (ZapA, ZapB, ZapC και ZapD), που εμφανίζουν λειτουργικά περιττό ρόλο στη δέσμευση και ομαδοποίηση των πολυμερών της FtsZ. Αυτές οι πρωτεΐνες προωθούν τη μετάβαση των πολυμερών της FtsZ από μια ελικοειδή ταινία σε ένα

συμπαγές δακτυλίδι μέσω της συνεργατικής διέγερσης της πλευρικής σύνδεσης των πρωτοϊνιδίων (Rico et al., 2013).

Δύο πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, η FtsA και η ZipA, δεσμεύονται άμεσα με την FtsZ και σχηματίζουν τον πρώιμο δακτύλιο, ένα αρχικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που συμβάλλει στη διατήρηση της σύνδεσης με τη μεμβράνη και στην ακεραιότητα του FtsZ δακτυλίου (Rueda et al., 2003). Η FtsA είναι μια ATP-δεσμευόμενη πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογενείας ακτίνης/Hsp70 (van den Ent and Lowe, 2000). Η αυτο-αλληλεπίδραση της FtsA είναι απαραίτητη για τη διαδικασία διαίρεσης του βακτηρίου *E. coli* (Rico et al., 2004). Η ενεργότητα ATPάσης της FtsA δεν έχει εδραιωθεί, ίσως επειδή η υδρολυτική ενεργότητα της είναι χαμηλή και ένας άγνωστος συμπαράγοντας απαιτείται *in vivo* για την πλήρη ενεργοποίηση της. Μια σύντομη C-τελική αμφιπολική έλικα της FtsA είναι υπεύθυνη για την προσήλωσή της στη μεμβράνη (Pichoff and Lutkenhaus, 2005). Η FtsA είναι επίσης ένας βασικός σύνδεσμος μεταξύ των συστατικών του πρώιμου δακτυλίου και μερικών κατάντη πρωτεϊνών συναρμολόγησης του δακτυλίου, όπως η PBP3 (ή FtsI) και η FtsN (Corbin et al., 2004; Rico et al., 2004). Η ZipA είναι μια πρωτεΐνη μεμβράνης τύπου III της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Hale και de Boer, 1997). Η υδρόφοβη κοιλότητα της σφαιρικής περιοχής της ZipA συνδέεται με το C-τελικό τμήμα της FtsZ (Mosyak et al., 2000). Η ZipA, βρίσκεται στη κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli* ως μονομερές ή ομοδιμερές. Το μονομερές παρέχει την προσκόλληση της FtsZ στη μεμβράνη. Η ομοδιμερική μορφή μπορεί να ενεργοποιήσει την παραγωγή ή τη σταθερότητα των πολυμερών της FtsZ κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης τμήματος του δακτυλίου (Skoog and Daley, 2012). Όπως αναφέρθηκε για την FtsA, επίσης και η ZipA προτείνεται ότι λειτουργεί στην πρόσληψη των κατάντη πρωτεϊνών σχηματισμού του δακτυλίου όπως η FtsK και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν αργότερα στο σχηματισμό του δακτυλίου, οι FtsQ, FtsL και FtsN (Hale and de Boer, 2002; Rico et al., 2010).

Σε μεταγενέστερο στάδιο κατά τη διάρκεια σχηματισμού του δακτυλίου, περίπου στο μισό του κύκλου της διαίρεσης ταχέως αναπτυσσόμενων κυττάρων (Aarsman et al., 2005), συμμετέχουν στο δακτύλιο οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, FtsE/FtsX, FtsK, FtsQ/FtsL/FtsB, FtsW/FtsI και τελικά η FtsN. Η πρόσληψη τους γίνεται με μια γραμμική ιεραρχία ώστε να σχηματιστεί το πλήρες πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που ξεκινάει το σχηματισμό του διαφράγματος και οδηγεί σε σύσφιξη (Lutkenhaus et al., 2012). Δεν είναι προς το παρόν σαφές γιατί υπάρχει καθυστέρηση μεταξύ των δύο σταδίων και τι ρυθμίζει το δεύτερο στάδιο της πρόσληψης των πρωτεϊνών (Pichoff et al., 2015).

Η FtsQ είναι μία πρωτεΐνη μεμβράνης τύπου II (Spiess, 1995) που φέρει ένα πολυπεπτιδίο μεταφοράς στο C-τελικό τμήμα της που σχετίζεται με τον τομέα POTRA (van den Ent et al., 2008) και απαιτεί την παρουσία της FtsK. Η FtsQ είναι απαραίτητη για την πρόσληψη των πρωτεϊνών FtsL, FtsB, FtsW και PBP3(FtsI) στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελεί το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης (Chen et al., 1999). Οι FtsL, FtsB και PBP3 είναι επίσης πρωτεΐνες μεμβράνης τύπου II, ενώ η FtsW είναι μια πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Spiess, 1995; Lara and Ayala, 2002) που μεταφέρει την πρόδρομη διαφραγματική πεπτιδογλυκάνη σε όλη την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Mohammadi et al., 2011). Η PBP3 είναι μια μονολειτουργική τρανσπεπτιδάση που καταλύει την διασταυρούμενη σύνδεση των μεταφερόμενων πρόδρομων διαφραγματικών πεπτιδογλυκάνων (Begg et al., 1990). Η λειτουργία των FtsL και FtsB δεν είναι γνωστή, αλλά η παρουσία τους είναι απαραίτητη για το σωστό σχηματισμό του δακτυλίου (Gonzalez et al., 2010). Η FtsL έχει προταθεί ότι συμμετάσχει στη μεταφορά του ψευδαργύρου κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Blencowe et al., 2011), αλλά αυτή η πιθανή λειτουργία δεν έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τη διαφραγματοποίηση. Κατά τη διάρκεια της διαίρεσης, οι FtsL, FtsB και FtsQ μπορούν να αλληλεπιδράσουν μέσω μιας εκτεταμένης ελικοειδούς δομής που καλύπτει τη μεμβράνη και τις περιπλασματικές περιοχές των πρωτεϊνών (Masson et al., 2009;

Lapointe et al., 2013). Η FtsN, είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή, μια μόνο διαμεμβρανική έλικα και μια συγκριτικά μεγάλη περιπλασματική περιοχή (Dai et al., 1996). Η FtsN είναι η τελευταία γνωστή απαραίτητη πρωτεΐνη που προσλαμβάνεται στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελεί το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης στο μικροοργανισμό *E.coli*. Η πρόσληψή της στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο πιστεύεται ότι είναι το έναυσμα για να ξεκινήσει η σύσφιξη, προτείνοντας κατά κάποιο τρόπο ότι η FtsN ενεργοποιεί τη σύνθεση των διαφραγματικών πεπτιδογλυκάνων (PG). Η FtsA αλληλεπιδρά με την FtsN και η ικανότητά της αυτή ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη ZipA. Η υπερέκφραση της FtsN μπορεί να παρακάμψει την αναγκαιότητα για την ZipA και ένα μοτίβο στην κυτταροπλασματική περιοχή της FtsN απαιτείται τόσο για την παράκαμψη της ZipA όσο και για την αλληλεπίδραση με την FtsA (Pichoff et al., 2015). Η αλληλεπίδραση FtsN-FtsA ωθεί την FtsA σε μια ενεργή κατάσταση ώστε να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί σύνθεσης πεπτιδογλυκάνης. Επιπλέον, ένα μικρό μέρος της περιπλασματικής περιοχής της FtsN φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο FtsQLB, ωθώντας το σε μια ενεργή κατάσταση που προκαλεί επίσης τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Έτσι, η FtsN ενεργοποιεί αλλοστερικά τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης μέσω δύο οδών, η μία στο κυτταρόπλασμα με τη συμμετοχή της FtsA και η άλλη στο περίπλασμα με τη συμμετοχή των FtsQLB (Weiss, 2015). Οι FtsE/FtsX, αποτελούν ένα σύμπλοκο μιας ATP-δεσμευόμενης πρωτεΐνης και ενός μεταφορέα, το οποίο δρα ως ρυθμιστής της υδρόλυσης του κυτταρικού τοιχώματος στο χώρο της διαίρεσης. Κατά την αλληλεπίδρασή τους με την FtsZ, η FtsE υπόκειται σε αλλαγές διαμόρφωσης που διαμεσολαμβάνονται από την υδρόλυση του ATP ώστε να τροποποιήσει τη διαμεμβρανική FtsX. Η τροποποίηση ευνοεί την πρόσληψη του ενεργοποιητή αμιδάσης EnvC από την FtsX στο περίπλασμα (Corbin et al., 2007; Yang et al., 2011).

#### A.4.1.2 Ρύθμιση της θέσης της κυτταρικής διαίρεσης και του σχηματισμού του του Z-δακτυλίου

Η κυτταρική διαίρεση εξαρτάται από τον εντοπισμό των πολυάριθμων πρωτεϊνών απαραίτητων για τη διαίρεση στο σωστό κυτταρικό σημείο, στο μέσο του κυττάρου (midcell), την κατάλληλη στιγμή στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η πρώτη και κύρια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο μέσο του κυττάρου όπως αναφέρθηκε είναι η πρωτεΐνη FtsZ, η οποία συναρμολογεί στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης το Z-δακτύλιο. Δύο αρνητικά ρυθμιστικά συστήματα, της πυρηνοειδούς απόφραξης (NO) και το σύστημα Min, έχουν περιγραφεί ώστε να προσδιορίζεται η θέση του σημείου διαίρεσης στο μέσο του κυττάρου. Η συνδυασμένη δράση τους αναστέλλει τον πολυμερισμό της FtsZ, μη επιτρέποντας τη συναρμολόγηση του πρώιμου-δακτυλίου σε άλλο σημείο εκτός από το κέντρο του κυττάρου.

Η πυρηνοειδής απόφραξη αναστέλλει το σχηματισμό του Z-δακτυλίου πάνω από το DNA, και στο βακτήριο *E. coli* διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη SlmA. Η SlmA δεσμεύεται σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης διάσπαρτες γύρω από το χρωμόσωμα εκτός από την περιοχή του άκρου, τη θέση λήξης της αντιγραφής (Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011). Αυτό το πρότυπο της δέσμευσης έχει ως αποτέλεσμα ο Z-δακτύλιος να μην συγκεντρώνεται γύρω από το χρωμοσωμικό DNA εκτός από την περιοχή λήξης της αντιγραφής, όπου συναρμολογείται συνήθως. Δύο πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους αναστέλλει η SlmA το σχηματισμό του Z-δακτυλίου έχουν προταθεί. Το πρώτο μοντέλο προϋποθέτει ότι η SlmA προκαλεί τον αποπολυμερισμό των πρωτοϊνιδίων της FtsZ (Cho et al., 2011; Du and Lutkenhaus, 2014). *In vitro* μελέτες δείχνουν ότι ο αποπολυμερισμός της FtsZ συμβαίνει σε σημαντικό ποσοστό μόνο όταν η SlmA δεσμεύεται στο DNA σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης (Cho et al., 2011). Κατά συνέπεια, ο αποπολυμερισμός των πρωτοϊνιδίων της, πραγματοποιείται σε κάθε περίπτωση στο πυρηνοειδές εκτός

από την περιοχή του άκρου του αναδιπλασιασμού. Η DNA-δεσμευμένη SlmA συνδέεται με το ιδιαίτερα συντηρημένο C-τελικό άκρο της FtsZ όπου ανταγωνίζεται για σύνδεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την FtsZ, συμπεριλαμβανομένων των ZipA, FtsA, ZapD, MinC και ClpX (Du and Lutkenhaus, 2014). Αυτό προωθεί περαιτέρω την αλληλεπίδραση μεταξύ της SlmA και της FtsZ, οδηγώντας σε θράυση των πρωτοϊνιδίων της ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα GTPάσης της FtsZ (Cho et al., 2011). Σε ένα εναλλακτικό μοντέλο, έχει προταθεί ότι η DNA-δεσμευμένη SlmA δεν αποπολυμερίζει τα πρωτοϊνίδια αλλά, αντίθετα, τα συλλαμβάνει και τα καθιστά ανίκανα να σχηματίσουν το Z-δακτύλιο (Tonthat et al., 2011, 2013). Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες ώστε να κατανοηθεί η λειτουργία της SlmA.

Το σύστημα Min του μικροοργανισμού *E. coli* αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, τις MinC, MinD και MinE. Μαζί, αναστέλλουν τον πολυμερισμό της FtsZ στους πόλους του κυττάρου και ως εκ τούτου εμποδίζουν την παραγωγή των μη βιώσιμων απύρηνων μικροκυττάρων. Αν και με χαμηλή δραστηριότητα, η MinC είναι επαρκής για να αναστείλει τη συναρμολόγηση των πολυμερών FtsZ (Shiomi and Margolin, 2007). Έχει προταθεί ότι το C-τελικό άκρο της MinC αλληλεπιδρά άμεσα με τα ινίδια της FtsZ, αποτρέποντας τις FtsZ-FtsZ πλευρικές αλληλεπιδράσεις και διαταράσσοντας τις αλληλεπιδράσεις της FtsZ με τις FtsA και ZipA, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του Z-δακτυλίου (Dajkovic et al., 2007; Shen and Lutkenhaus, 2010). Επίσης, οι Arumugam et al., 2014 προτείνουν ότι η MinC συλλαμβάνει τα πρωτοϊνίδια της FtsZ. Παρατήρησαν ότι τα ινίδια της FtsZ χάνουν μονομερή καθ'όλο το μήκος τους και αυτή η απώλεια οδηγεί σε φράγματα και κενά στα ινίδια. Σε περίπτωση απουσίας της MinC αυτά τα φράγματα θα μπορούσαν να ενωθούν με την προσθήκη νέων μονομερών αλλά παρουσία της κάλυψης από τη MinC δεν μπορεί να συμβεί και τα ινίδια αποσταθεροποιούνται (Arumugam et al., 2014). Η MinD είναι μια ATPάση που ενεργοποιεί και σταθεροποιεί την MinC στη μεμβράνη. Η MinE ρυθμίζει τον εντοπισμό του συμπλόκου MinCD και τον περιορίζει προς τους πόλους των κυττάρων, επιτρέποντας έτσι τη διάταξη του δακτυλίου της FtsZ μόνο στο μέσο του κυττάρου (Rico et al., 2013). Η ικανότητα του συστήματος MinCDE να τροποποιεί την τοποθέτηση των πρωτεϊνών δεν περιορίζεται στις πρωτεΐνες της διαφραγματοποίησης, αφού επηρεάζει επίσης τον εντοπισμό σε πολικές εστίες πρωτεϊνών που δεν σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση, όπως η TnaA ή οι GroES (Li and Young, 2012).

Τέλος, πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι υπάρχει επίσης και ένας θετικός μηχανισμός ρύθμισης στο μικροοργανισμό *E. coli*, ο οποίος καθοδηγεί τις πρωτεΐνες της κυτταρικής διαίρεσης προς την περιοχή λήξης του αναδιπλασιασμού του χρωμοσώματος (Bailey et al., 2014). Μελέτες δείχνουν ότι η θέση λήξης της αντιγραφής του χρωμοσώματος είναι στερεωμένη στο Z-δακτύλιο (Espeli et al., 2012). Η θέση λήξης της αντιγραφής του χρωμοσώματος στο βακτήριο *E. coli* αποτελεί μια συμπαγή «οντότητα», που ονομάζεται το Ter μάκρο-περιοχή (MD) και διοργανώνεται από την πρωτεΐνη MatP (Dupaigne et al., 2012). Η MatP, όπως η SlmA, είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA. Οι θέσεις σύνδεσης αυτών των δύο πρωτεϊνών στο χρωμοσωμικό DNA είναι απολύτως συμπληρωματικές. Οι ειδικές θέσεις δέσμευσης της MatP, 23 στο σύνολο, βρίσκονται μόνο σε μια έκταση 800 kb γύρω από την ακολουθία dif στη θέση λήξης της αντιγραφής, ενώ οι θέσεις πρόσδεσης της SlmA βρίσκονται, ουσιαστικά, οπουδήποτε αλλού. Οι Espeli et al., 2012 έδειξαν ότι η πρόσδεση της περιοχής Ter στο Z-δακτύλιο συμβαίνει λόγω της αλληλεπίδρασης του C-τελικού άκρου της MatP με την πρωτεΐνη ZapB, η οποία αλληλεπιδρά έμμεσα με την FtsZ μέσω της ZapA (Galli and Gerdes, 2010). Η σύνδεση αυτή που αναφέρεται ως σύνδεση Ter και συνδέει τη θέση λήξης της αντιγραφής στο Z-δακτύλιο μέσω μιας αλυσίδας DNA-MatP-ZapB-ZapA-FtsZ. Η λειτουργία της σύνδεσης δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Δύο διαδοχικές διεργασίες συμβαίνουν στο συντονισμό του Z-δακτυλίου και της θέσης λήξης της αντιγραφής.

Αρχικά, ένα σήμα από την θέση λήξης της αντιγραφής προωθεί την συναρμολόγηση του Z-δακτυλίου στο άμεσο περιβάλλον της και δεύτερον, μετά το σχηματισμό του Z-δακτυλίου η θέση λήξης της αντιγραφής συνδέεται με το Z-δακτύλιο με μια σύνδεση που περιλαμβάνει τις MatP, ZapB και ZapA (Bailey et al., 2014).

#### A.4.1.3 Σύνδεση του διαφραγματικού δακτυλίου και του αποχωρισμού των χρωμοσωμάτων

Υπό κανονικές συνθήκες, η κυτταρική διαίρεση δεν έχει ολοκληρωθεί, εκτός εάν το χρωμόσωμα έχει αντιγραφεί πλήρως και τα δύο αντίγραφα έχουν διαχωριστεί. Το χρωμόσωμα του βακτηρίου *E. coli* είναι οργανωμένο σε δύο μη-δομημένες (NS) περιοχές (Espeli et al., 2012) και τέσσερις διακριτά δομημένες μακρο-περιοχές (MD): Ori, Right, Left και Ter MDs (Niki et al., 2000). Η περιοχή Ori MD περιλαμβάνει την θέση έναρξης της αντιγραφής (ori) και η περιοχή Ter MD περιλαμβάνει την θέση λήξης της αντιγραφής (ter) και τη περιοχή διαχωρισμού του διμερούς χρωμοσώματος (dif). Η περιοχή dif είναι μια ακολουθία 28bp στην θέση λήξης της αντιγραφής όπου το διμερές χρωμόσωμα επιλύεται από την ανασυνδυάση XerCD.

Ο κυτταροπλασματικός διαφραγματικός δακτύλιος ολοκληρώνεται με την πρόσληψη της πρωτεΐνης FtsK. Στο βακτήριο *E. coli* η FtsK είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη, ενσωματωμένη στη κυτταροπλασματική μεμβράνη που συντονίζει το διαχωρισμό του χρωμοσώματος με την κυτταρική διαίρεση (Liu et al., 1998). Η FtsK, είναι μια DNA μεταθετάση με έναν μεμβρανικό τομέα που περιέχει 4 διαμεμβρανικά τμήματα συντηγμένα στον τομέα DNA μεταθετάσης από ένα μακρύ συνδέτη. Το C-τελικό άκρο της αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες, τις Kops (Bigot et al., 2005), που βρίσκονται στη Ter MD περιοχή και επιλύει, χωρίς θραύση, τα διμερή χρωμοσώματα, που έχουν δημιουργηθεί μέσω γενικού ανασυνδιασμού, σε μονομερή μέσω της μετατόπισής της κατά μήκος του DNA και της αλληλεπίδρασής της με το σύστημα ειδικού ανασυνδιασμού XerCD (Bigot et al., 2005) ή τη τοποϊσομεράση IV ώστε να καταστεί δυνατή η σωστή διαλογή των χρωμοσωμάτων πριν από το κλείσιμο του διαφράγματος (Espeli et al., 2003). Το αμινοτελικό άκρο της FtsK είναι ενσωματωμένο στη κυτταροπλασματική μεμβράνη και είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου της κυτταρικής διαίρεσης (Dorazi and Dewar, 2000). Στο βακτήριο *E. coli*, η λειτουργία του N-τελικού άκρου δεν μπορεί να αποσυνδεθεί από του C-τελικού άκρου (Bigot et al., 2004). Η FtsK του μικροοργανισμού *E. coli* προτάθηκε να λειτουργεί ως μέρος της βακτηριακής αντίδρασης SOS (Draper et al., 1998). Επιπλέον, δείχθηκε ότι το γονίδιο *ftsK* συνδέεται με τη D-αλανίνη της καρβόξυ-πεπτιδάσης PBP5 (πρωτεΐνη πενικιλίνη-σύνδεση) (Draper et al., 1998), η οποία συνδέει την FtsK με την PBP3 και τη διαφραγματική σύνθεση πεπτιδογλυκάνης (Chen and Beckwith, 2001). Η βασική λειτουργία όμως της FtsK, έγκειται στα 4 διαμεμβρανικά τμήματα και πιθανώς παίζει ένα ρόλο ανάλυσης της μεμβράνης ώσπου η κυτοκίνηση να ολοκληρωθεί (Fleming et al., 2010).

#### A.4.1.4 Η σύσφιξη της μεμβράνης και η εξέλιξη του διαφράγματος

Μόλις το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελεί το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης συναρμολογηθεί πλήρως, όλα τα στρώματα που αποτελούν το περίβλημα των κυττάρων είναι συνδεδεμένα και αρχίζει η διαδικασία της σύσφιξης. Η δύναμη της σύσφιξης φαίνεται να ασκείται από το κυτταρόπλασμα τραβώντας το περίβλημα του κυττάρου προς τα μέσα. Τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι ο κύριος κινητήρας που ασκεί τη δύναμη που απαιτείται για τη σύσφιξη είναι η ίδια η FtsZ.

Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί ώστε να περιγραφεί ο τρόπος με τον οποίο η FtsZ μπορεί να ασκήσει ελκτική δύναμη. Αφορούν είτε τη κάμψη είτε τη συμπίκνωση των πολυμερών της FtsZ και δεν



αλληλοαποκλείονται. Στο πρώτο μοντέλο της κάμψης, η κινητήρια δύναμη ασκείται αποκλειστικά από την FtsZ σε έναν κύκλο πολυμερισμού, προσκόλληση της μεμβράνης, διαμορφωτική αλλαγή, αποπολυμερισμού και ανταλλαγή νουκλεοτιδίων, όλα να οδηγούνται από την υδρόλυση του GTP (Li et al., 2007). Η κάμψη που ανιχνεύεται σε περιοχές των λιποσωμάτων πλούσιες σε FtsZ δεν είναι σταθερή, αφού επιπλέον πρωτεΐνες του διαφράγματος, όπως η πεπτιδογλυκάνη, είναι απαραίτητες ώστε να σχηματίσουν μια σταθερή δομή, καθώς εξελίσσεται η σύσφιξη (Osawa et al., 2008). Σε αυτό το μοντέλο, η υδρόλυση του GTP θα συμμετάσχει στην τροποποίηση της καμπυλότητας των πολυμερών της FtsZ (Lu et al., 2000).

Στο μοντέλο της συμπύκνωσης, η δύναμη σύσφιξης παράγεται από την πλευρική έλξη μεταξύ διαφορετικών ινιδίων της FtsZ που αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν μια συμπαγή δομή (Lan et al., 2009). Τα αποτελέσματα από την *in silico* μοντελοποίηση δείχνουν ότι ο δακτύλιος της FtsZ μπορεί να υφίσταται μετάπτωση από μια κατάσταση χαμηλής πυκνότητας σε μια υψηλής, με συμπύκνωση των πρωτοϊνιδίων και όχι με την πρόσληψη περισσότερων FtsZ μονομερών. Σε αυτό το μοντέλο, η υδρόλυση του GTP διευκολύνει μια σταδιακή μορφολογική αλλαγή από μια χαλαρή έλικα σε ένα συμπαγές FtsZ δακτύλιο μέσω της διευκόλυνσης του κύκλου εργασιών μονομερούς κατά τη διάρκεια της συμπύκνωσης (Ghosh and Sain, 2011). Η αύξηση του αριθμού των πλευρικών επαφών μεταξύ των πρωτοϊνιδίων τα συμπιέζει, προκαλώντας μια μετατόπιση από ένα χαλαρό σπирάλ που εκτείνεται κατά μήκος του κυττάρου σε ένα συμπαγές δακτύλιο που βρίσκεται στο μέσο του κυττάρου. Ο FtsZ δακτύλιος συμπυκνώνεται περαιτέρω καθ' όλη τη διάμετρο του κυττάρου ώστε να σχηματίσει μια παχύτερη δακτυλιοειδή δομή, με τη διάμετρο να μειώνεται καθώς εξελίσσεται η σύσφιξη (Rico et al., 2013). Οι Zap πρωτεΐνες, όπως η ZapA ή η ZapB, έχουν προταθεί ώστε να βοηθούν σε αυτό το μηχανισμού (Small et al., 2007). Στο τέλος της σύσφιξης, ο συμπυκνωμένος στενός δακτύλιος αποσυναρμολογείται γρήγορα και κλείνει το διάφραγμα (Fu et al., 2010).

#### A.4.1.5 Η σύνθεση του πλευρικού τοιχώματος

Εκτός από τα κοκκοειδή βακτήρια, η ανάπτυξη των βακτηρίων απαιτεί την κατά μήκος επέκταση του κυλινδρικού πλευρικού τοιχώματος. Η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του πλευρικού κυτταρικού τοιχώματος και πραγματοποιείται με το σύμπλοκο επιμήκυνσης (elongasome) (Nanninga, 1998). Ομοίως, μια εγκάρσια ζώνη ανάπτυξης πεπτιδογλυκάνης (septosome) εμπλέκεται στη σύνθεση του διαφράγματος (Nanninga, 1998; Egan and Vollmer, 2013). Έχει περιγραφεί μια χωρική και χρονική σύμπτωση του συμπλόκου επιμήκυνσης και της εγκάρσια ζώνης ανάπτυξης πεπτιδογλυκάνης (van der Ploeg et al., 2013) και η έναρξη της διαφραγματικής σύνθεσης πεπτιδογλυκάνης φαίνεται ότι συμβαίνει ωρίς κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που αποτελεί το μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης (Potluri et al., 2012). Η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της FtsZ και της MreB (Fenton and Gerdes, 2013) επισημαίνει αυτή την χωρική και χρονική σύμπτωση.

Η σύνθεση του πλευρικού τοιχώματος στα περισσότερα ραβδόμορφα βακτήρια απαιτεί τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης MreB, βακτηριακό ομόλογο της ακτίνης (van den Ent et al., 2001). Η MreB είναι σημαντική για τη διατήρηση του ραβδόμορφου σχήματος στο βακτήριο *E.coli* (Kruse et al., 2005). Μελέτες εντοπισμού με μικροσκοπικές τεχνικές υψηλής ανάλυσης προτείνουν ότι η MreB αποτελεί διακριτά επιθέματα που περιστρέφονται κατά μήκος της κυτταρικής περιφέρειας κάθετα προς το μεγάλο άξονα του κυττάρου, σε αντίθεση με παλαιότερες που πρότειναν ότι σχηματίζει μια ελικοειδή διαδρομή για τη σύνθεση των πεπτιδογλυκάνων που εκτείνεται σε όλο το κύτταρο (Cho, 2015). Επιπλέον, πρόσφατα έχει προταθεί ότι η MreB βοηθά στη διατήρηση του ραβδόμορφου σχήματος,

κατευθύνοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης στις περιοχές αρνητικής καμπυλότητας του κυτταρικού τοιχώματος, αφού αυτές αποτελούν περιοχές εμπλουτισμένες με την MreB και συσχετίζουν τον εντοπισμό της MreB και τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (Ursell et al., 2014).

Η σύνθεση των διαφραγματικών και πλευρικών ζωνών πεπτιδογλυκάνης συνδέεται με την απομάκρυνση των παλαιών υλικών από τη δράση των υδρολασών και αμιδασών πεπτιδογλυκάνης (Park and Uehara, 2008; Vollmer et al., 2008). Οι PBP1A και PBP1B είναι διλειτουργικές πρωτεΐνες (με δραστηριότητα γλυκοζυλο-τρανσφεράσης και τρανσπεπτιδάσης) που συμμετέχουν στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης στο πλευρικό κυτταρικό τοίχωμα (Egan and Vollmer, 2013). Η LpoA είναι μια λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης, συν-παράγοντας, που απαιτείται για την ενεργότητα της PBP1A (Typhas et al., 2010). Η EnvC είναι μια περιπλασμική πρωτεΐνη που σχετίζεται με το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο της κυτταρικής διαίρεσης και ρυθμίζει την ενεργότητα των περιπλασμικών αμιδασών AmiA και AmiB, ενώ αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη της διαίρεσης FtsX (Yang et al., 2011). Οι αμιδάσες υδρολύουν τα διασυνδεδεμένα πεπτιδία πεπτιδογλυκάνης μεταξύ των μεμονωμένων κλώνων γλυκάνης (Uehara et al., 2010). Ο ρόλος των FtsE και FtsX στην διαίρεση των κυττάρων σχετίζεται με την ενεργοποίησή τους από τις αμιδάσες AmiAB. Η αλληλεπίδραση της FtsE (Corbin et al., 2007) με την FtsZ οδηγεί το σύμπλοκο FtsEX στο μέσο του κυττάρου όπου η υδρόλυση του ATP μέσω μεσολάβησης της FtsE τροποποιεί τη δομή των FtsX ολιγομερών. Αυτή η αλλαγή προτάθηκε ότι επηρεάζει την EnvC, η οποία με τη σειρά της, προτάθηκε ότι ενεργοποιεί τις περιπλασμικές αμιδάσες AmiAB. Η δραστηριότητα των αμιδασών χρησιμεύει για να αναδιαμορφώσει την αυξανόμενη πεπτιδογλυκάνη που λαμβάνει χώρα στη περιοχή διαφραγματοποίησης (Yang et al., 2011).

## A.5 Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli*

Το βακτήριο *E. coli* είναι ένα γ-πρωτεοβακτήριο, ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και πρόκειται για ένα αρνητικό κατά Gram, μη σποριογόνο βακτήριο. Αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της βιόσφαιρας και αναπτύσσεται στον εντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου, και ως ένας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, επιβιώνει όταν απελευθερώνεται στο φυσικό περιβάλλον, επιτρέποντας την ευρεία διάδοση του σε νέους ξενιστές (Blattner et al., 1997). Τα κύτταρα του, είναι ραβδοειδούς σχήματος ωστόσο μερικές φορές παίρνουν μορφή κοκκοβακτηριδίου και άλλοτε νηματοειδή, ενώ το μήκος τους κυμαίνεται από 1-5  $\mu\text{m}$ , το πάχος τους είναι 0.5  $\mu\text{m}$  και ο όγκος τους 0.6-0.7  $\mu\text{m}^3$  (Kubitschek, 1990). Είναι περίτριχο βακτήριο που κινείται, υπάρχουν όμως και μη κινητά στελέχη. Ανακαλύφθηκε στο ανθρώπινο παχύ έντερο το 1885 από το γερμανό βακτηριολόγο Theodor Escherich, ο οποίος έδειξε επίσης ότι ορισμένα στελέχη του βακτηρίου ήταν υπεύθυνα για την εμφάνιση βρεφικής διάρροιας και γαστρεντερίτιδας, μια σημαντική ανακάλυψη για τη δημόσια υγεία. Αρχικά ονομάστηκε *Bacterium coli*, αργότερα του δόθηκε η ονομασία *Escherichia coli* προς τιμήν του βακτηριολόγου που το ανακάλυψε.

Το *E. coli* είναι ευπροσάρμοστο στις περιβαλλοντικές συνθήκες και ανταποκρίνεται αποτελεσματικά σε περιβαλλοντικά σήματα, όπως είναι διάφορα χημικά, το pH, η θερμοκρασία, η οσμωτικότητα και άλλα, ενώ έχει την ικανότητα αίσθησης της παρουσίας ή απουσίας χημικών ουσιών και αερίων στο περιβάλλον ανάπτυξής του, πλησιάζοντας προς αυτές ή κινούμενο μακριά από αυτές, με την κολυμβητική κίνηση. Εναλλακτικά αναπτύσσει κροσσούς που το βοηθούν στον αποικισμό μιας επιφάνειας (Sousa, 2006).

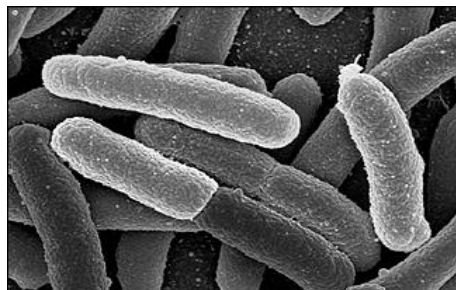
Επιβιώνει και αναπτύσσεται σε μια πληθώρα υποστρωμάτων, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ. Εκτός από γλυκόζη και λακτόζη, έχει τη δυνατότητα ζύμωσης και

άλλων σακχάρων (μαλτόζη, μαννιτόλη, ξυλόζη), κατά την οποία παράγονται οξέα και αέρια. Λόγω του ότι πολλά μεταβολικά μονοπάτια απελευθερώνουν υδρογόνο, το *E. coli* συμβιώνει με μεθανογόνους μικροοργανισμούς ή θειοαναγωγικά βακτήρια προκειμένου οι δεύτεροι να μειώνουν τα επίπεδα υδρογόνου, καθιστώντας το περιβάλλον ευνοϊκότερο για την ανάπτυξη του (Madigan and Martinko, 2006). Επίσης, παράγει ινδόλη ενώ δε χρησιμοποιεί το κιτρικό νάτριο ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το *E. coli* αποτελεί ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο με θερμοκρασία ανάπτυξης από 7-10°C έως 49°C (Fotadar et al., 2005) και άριστη θερμοκρασία τους 37 °C. Το βέλτιστο pH ανάπτυξής του είναι κοντά στο ουδέτερο αλλά η ανάπτυξη του είναι δυνατή ακόμα και σε pH 4.4.

Η οροτυπική ταξινόμηση του *E. coli* γίνεται με βάση τις κυριότερες αντιγονικές ομάδες: σωματικά αντιγόνα-O (160 τύποι), βλεφαριδικά αντιγόνα-H (60 τύποι) και αντιγόνα ελύτρου ή K αντιγόνα (100 τύποι). 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. Χαρακτήρες παθογονικότητας εκτός από τις αντιγονικές ομάδες είναι η παραγωγή εντεροτοξινών, αιμολυσινών, προσκολλησινών, τοξικών αντιγονικών ουσιών, η διεισδυτικότητα κ.α. Τα στελέχη *E. coli* που είναι υπεύθυνα για τη γαστρεντερίτιδα περιλαμβάνουν τέσσερις ομάδες: τα εντεροτοξιογόνα (ETEC), τα εντεροδιεισδυτικά (EIEC), τα εντεροπαθογόνα (EPEC) και τα εντεροαιμορραγικά (EHEC) ή Vero-κυτταροτοξικά (VTEC).

Η πρώτη πλήρης DNA αλληλούχηση του γονιδιώματος ενός στελέχους *E. coli* δημοσιεύτηκε το 1997 και αφορούσε το εργαστηριακό στέλεχος K-12 MG1655 παράγωγο. Το γονιδίωμα βρέθηκε να είναι ένα κυκλικό μόριο DNA, 4,6 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων σε μήκος, τα οποία περιέχουν 4.288 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (οργανωμένα σε 2.584 οπερόνια), επτά ριβοσωμικά RNA (rRNA) οπερόνια και 86 γονίδια μεταφορικού RNA (tRNA). Το γονιδίωμα παρατηρήθηκε να περιέχει ένα σημαντικό αριθμό μεταθετών γενετικών στοιχείων, επαναλαμβανόμενων στοιχείων, υπολείμματα κρυπτικών προφάγων και βακτηριοφάγων (Blattner et al., 1997). Σήμερα, πολλές εκατοντάδες αλληλουχίσεις πλήρους γονιδιώματος του γένους *Escherichia* είναι διαθέσιμες.

Το *E. coli* λόγω της ευκολίας χειρισμού του, παίζει σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη μικροβιολογία και στη βιοτεχνολογία, ενώ αποτελεί τον καταλληλότερο μικροοργανισμό για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Μερικά από αυτά είναι ο υψηλός ρυθμός αύξησής του, η παραγωγή υψηλής κυτταρικής βιομάζας, η απλή γενετική, η υψηλού ρυθμού μεταγραφή κλωνοποιημένων γονιδίων, καθώς φέρει πολλαπλά αντίγραφα πλασμιδιακών φορέων έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών και το ευρύ φάσμα γενετικών μεθόδων και εργαλείων που μπορούν να εφαρμοσθούν σε αυτό.



**Εικόνα A3.7.:** Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικονίζει τα κύτταρα του μικροοργανισμού *E. coli*. Πηγή: (Brookhaven National Laboratory, bnl.gov).

## A.6 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός των μελών δύο εκ των οικογενειών των ΡΡΪασών, των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών, του μικροοργανισμού *Escherichia coli* προκειμένου να διασαφηνιστεί ο φυσιολογικός τους ρόλος. Εντοπίστηκαν τρία και δύο γονίδια αντίστοιχα, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ανήκουν στις παρβουλίνες και στις κυκλοφιλίνες και ο φυσιολογικός τους ρόλος μελετήθηκε μέσω της ανάπτυξης, σε διαφορετικές συνθήκες, των *E. coli* στελεχών στα οποία έχει πραγματοποιηθεί απαλοιφή για το κάθε γονίδιο. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου *E. coli* σε συνθήκες καταπόνησης, στην κινητικότητα και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν η ενεργότητα ΡΡΪάσης αυτών των ενζύμων είναι απαραίτητη για τους παρατηρούμενους φαινότυπους. Για αυτό το σκοπό, κατασκευάστηκαν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο κάθε πρωτεΐνης και υπερεκφράστηκαν στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη, τα οποία μελετήθηκαν σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου. Επιπλέον, ερευνήθηκε η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ΡΡΪασών. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τόσο η ομαδική κίνηση όσο και ο σχηματισμός βιοϋμενίου ρυθμίζονται σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο, αναζητήθηκαν και ελέγχθηκαν αλληλεπιδράσεις των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών με πρωτεΐνες στόχους, μέσω των οποίων πιθανώς εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτών των συνθηκών ανάπτυξης. Τέλος, ελέγχθηκε η κυτταρική μορφολογία όλων των στελεχών στις παραπάνω συνθήκες και διερευνήθηκε η συμμετοχή των μελετούμενων πρωτεϊνών στη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης μέσω της συσχέτισης με πρωτεΐνες άμεσα ή έμμεσα εμπλεκόμενες στη διαδικασία αυτή.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## B. Υλικά και μέθοδοι

### B.1 *In silico* μελέτη των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών

Η αναζήτηση των γονιδίων του μικροοργανισμού *E. coli* που κωδικοποιούν για τις παρβουλίνες και τις κυκλοφιλίνες πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Η αναζήτηση των τρισδιάστατων δομών τους πραγματοποιήθηκε μέσω του διαδικτυακού ιστότοπου PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Επίσης, η πρόβλεψη του υποκυτταρικού εντοπισμού των μελετούμενων ΠΡΙΑσών του μικροοργανισμού *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 παρβουλίνες και τις κυκλοφιλίνες 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 bactotryptone, 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 προσθήκη 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*, BW25113 (BW25113: *rrnB3*  $\Delta$ lacZ4787 *hsdR514*  $\Delta$ (*araBAD*)567  $\Delta$ (*rhaBAD*)568 *grh-1*) και όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ελήφθησαν από το Stock Center *E. coli* Genetic. Όλα τα pCA24N και pCA24N-GFP πλασμίδια με διάφορα κλωνοποιημένα γονίδια ελήφθησαν από τη βιβλιοθήκη ASKA του NARA Institute (Kitagawa et al., 2005). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *E. coli* BL21 DE3, XL-Blue.

### B.3 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

#### B.3.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωµατικού DNA από Gram (-) βακτήρια

Για την απομόνωση γονιδιωµατικού DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από την εταιρία Macherey-Nagel (MN-NucleoSpin Tissue Kit). Αρχικά μια αποικία μετασχηματισμένων με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 5 mL θρεπτικού υλικού LB, με την κατάλληλη προσθήκη αντιβιοτικών. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 30 °C για 20 ώρες. Από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε, μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται σχολαστικά και στο σωλήνα erpendorf παραμένει μόνο το ίζημα των κυττάρων. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 180 µl διαλύματος λύσης T1 (lysis buffer, περιέχει RNase A) 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. Στη συνέχεια προστίθενται 200 µl διαλύματος B3, ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος για περίπου 15 δευτερόλεπτα και επωάζεται 10 λεπτά στους 70 °C. Προστίθενται στο δείγμα 210 µl αιθανόλης (95-100%) και αναδεύεται καλά για 5-10 δευτερόλεπτα μέχρι να ομογενοποιηθεί, μεταφέρεται σε κολώνα NucleoSpin Tissue column και φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που εκλούεται απορρίπτεται και στη στήλη προστίθενται 500 µl διαλύματος Wash Solution 1 (W0263), ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που εκλούεται απορρίπτεται και ακολουθεί δεύτερο πλύσιμο, προσθέτοντας στη στήλη 500 µl διαλύματος Wash Solution (περιέχει αιθανόλη) και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει η στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα Wash Solution καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις. Η στήλη τοποθετείται σε καινούριο σωλήνα erpendorf και ακολουθεί έκλυση του DNA από αυτήν. Προστίθενται 20-30 µl ddH<sub>2</sub>O κατευθείαν στο κέντρο της στήλης, και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να αυξηθεί η έκλυση. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 10.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου 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 (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής: 1) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2) υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) σύνθεση αντιγράφων DNA (μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια) (extension). Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησεως μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του και συγκεκριμένα στην περίπτωση πλασμιδιακού DNA προστίθεται από 1 µg 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. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους ( $T_m$ ).



Παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά μιας τυπικής αντίδρασης PCR.

DNA μήτρα	1 µg
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (30 µM)	1 µl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (30 µM)	1 µl
Μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	1 µl
10 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5 µl
DMSO(διμεθυλοσουλφοξείδιο)	2,5 µl
DNA πολυμεράση (1 u/µL)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	έως τελικό όγκο 50 µl

Γενικά, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	45-65 °C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 °C για 1 λεπτό/1.3-15 kb αναμενόμενου προϊόντος	
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 10 λεπτά	

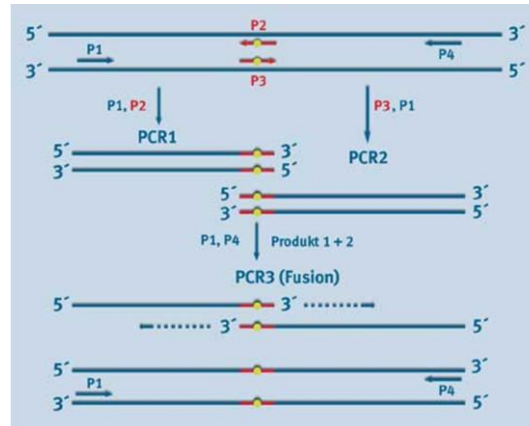
Το πρόγραμμα δυο σταδίων (PCR *site-directed mutagenesis*) ή SOE (*Splicing by Overlap Extension*) (Horton, 1995) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση σημειακής μετάλλαξης στο ενεργό κέντρο ΡΡΙάσης της κάθε πρωτεΐνης είναι το εξής:

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.

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



**Εικόνα Β.1.:** Αναλυτική απεικόνιση των τριών αντιδράσεων PCR που ακολουθούνται κατά το πρόγραμμα SOE. (<http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v72.lasso>).

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

**Πίνακας Β.1.:** Κατάλογος εκκινητών

Όνομα Εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία Εκκινητών
<i>Ec.b0053.H.F</i>	5'-AAACCATGGAGAAGCTGGAAAACGCTGCTTCTC-3'
<i>Ec.b0053.H.R</i>	5'-AACCTCGAGGTTGCTCAGGATTTAACGTAGG-3'
<i>Ec.b0053.K293A.F</i>	5'-CGCCATATTCTGCTGGCACCCTCGCCGATCATG-3'
<i>Ec.b0053.K293A.R</i>	5'-CATGATCGGCGACGGTCCAGCAGAATATGGCG-3'
<i>Ec.b0116.S.F</i>	5'-GGGCATATGAGTACTGAAATCAAACCTCAGG-3'
<i>Ec.b0116.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTTCTTCTTCGCTTTCGGGTTC-3'
<i>Ec.b3178.S.F</i>	5'-GGGATTAATATGGCGAAAAACCTAATACTCTGGC-3'
<i>Ec.b3178.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTTGTTCGCTAACTGCTCTGACATG-3'
<i>Ec.b0014.S.F</i>	5'-GGGCATATGGGTAATAAATTGGTATCGACC-3'
<i>Ec.b0014.S.R</i>	5'-GGGCTCGAGTTTTTTGTCTTTGACTTCTTCA-3'
<i>Ec.b0441.H.F</i>	5'-AAAGGATCCGACAGCTTACGCACGGCTGCAA-3'
<i>Ec.b0441.H.R</i>	5'-GGGAAGCTTTTATTGCTGTTCCAGCGCATCG-3'
<i>Ec.b0727.S.F</i>	5'-GGGCATATGAGTAGCGTAGATATTCTGGTCC-3'
<i>Ec.b0727.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCACGTCCAGCAGCAGACGCGTC-3'
<i>Ec.b1852.S.F</i>	5'-AAACATATGGCGGTAACGCAAACAGCCCAGG-3'
<i>Ec.b1852.S.R</i>	5'-GGACTCGAGCTCAAACCTATTCCAGGAACGA-3'
<i>Ec.b3426.S.F</i>	5'-GGGCATATGGAAACCAAAGATCTGATTGTGA-3'
<i>Ec.b3426.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCGACGCCAGCGATAACCTCTGC-3'
<i>Ec.b1774.S.F</i>	5'-GGGCATATGAAAAATTCAAAGCAATATTGC-3'
<i>Ec.b1774.S.R</i>	5'-AAACTCGAGATCGCTAATTTTAATAACGCCT-3'
<i>Ec.b3775.H.F</i>	5'-AAAGGATCCGGCAAAAACAGCAGCAGCACTG-3'

<i>Ec.b3775.H.R</i>	5'-GGGAAGCTTTTAGTTGCGGTACAGCACCTTA-3'
<i>Ec.b3775.C41A.F</i>	5'-AAGAAACACTCCATTGCCCCATCAGGCAAACGC-3'
<i>Ec.b3775.C41A.R</i>	5'-GCGTTTGCTGATGGGGCAATGGAGTGTTCCTT-3'
<i>Ec.b2316.S.F</i>	5'-GGGCATTATGAGCTGGATTGAACGAATTAA-3'
<i>Ec.b2316.S.R</i>	5'-AAACAATTGGCCTCAGGTTCTGATCCGG-3'
<i>Ec.b2129.S.F</i>	5'-GGGCATATGATTGAATTTAGCCATGTCAGCA-3'
<i>Ec.b2129.S.R</i>	5'-AAAGGTACCCGCCTCCACCAGCAGATCCTGA-3'
<i>Ec.b0924.S.F</i>	5'-GGGCATATGATTGAACGCGGTAAATTTTCGCTC-3'
<i>Ec.b0924.S.R</i>	5'-AAACAATTGCTCGCCTGAGAAGGCGCTTCGTC-3'
<i>Ec.b0095.S.F</i>	5'-GGGCATATGTTTGAACCAATGGAACCTTACC-3'
<i>Ec.b0095.S.R</i>	5'-AAACAATTGTCAGCTTGCTTACGCAGGAATG-3'
<i>Ec.b0095.ΔC18.S.F</i>	5'-GGGCATATGTTTGAACCAATGGAACCTTACCAAT-3'
<i>Ec.b0095.ΔC18.S.R</i>	5'-AAACTCGAGAGTTTTCGCGCGCATTGTCATTCAC-3'
<i>Ec.b0958.S.F</i>	5'-AAACATATGTACACTTCAGGCTATGCACATC-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'-GGGCAATTGTGTTGTTCTGCCTGTGCCTGAT-3'
<i>Ec.b1176.S.F</i>	5'-AAACATATGTCAAACACGCCAATCGAGCTTA-3'
<i>Ec.b1176.S.R</i>	5'-AAACAATTGTTTAAACGGTTGAACGGTCAAAG-3'
<i>Ec.b3983.S.F</i>	5'-GGGCATATGGCTAAGAAAGTACAAGCCTAG-3'
<i>Ec.b3983.S.R</i>	5'-AAAGGTACCGTCCCTCCACTACCAGGCCAG-3'
<i>Ec.b3986.S.F</i>	5'-GGGCATATGTCTATCACTAAAGATCAAATC-3'
<i>Ec.b3986.S.R</i>	5'-AAAGGTACCTTTAACTTCAACTTCAGCGCC-3'
<i>Ec.b3363s.H.F</i>	5'-AAAGGATCCAGGGGACCCGCACGTATTGTTGAC-3'
<i>Ec.b3363s.H.R</i>	5'-GGGAAGCTTTTACGGCAGGACTTTAGCGGAAAG-3'
<i>Ec.b3363.F128A.F</i>	5'-GCCACCAGCCAGTTCGCTATCAACGTTGCCGAT-3'
<i>Ec.b3363.F128A.R</i>	5'-ATCGGCAACGTTGATAGCGAACTGGCTGGTGGC-3'
<i>Ec.b0525.H.F</i>	5'-AAAGGATCCAGTTACTTTCCACACCAATCACG-3'
<i>Ec.b0525.H.R</i>	5'-AGGAAGCTTTTACTCGCTAACGCTCACGCTT-3'
<i>Ec.b0525.F99A.F</i>	5'-GCAACTGCACAGTTCGCCATCAACGTGGTTGAT-3'
<i>Ec.b0525.F99A.R</i>	5'-ATCAACCACGTTGATGGCGAACTGTGCAGTTGC-3'
<i>Ec.b0525.R43A.F</i>	5'-AACACCATTTTCCACGCAAGTTATCAACGGCTTT-3'
<i>Ec.b0525.R43A.R</i>	5'-AAAGCCGTTGATAACTGCGTGGAAAATGGTGTT-3'
<i>Ec.b0525.S.F</i>	5'-GGGCATATGGTTACTTTCCACACCAATCACGGC-3'
<i>Ec.b0525.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTCGCTAACGGTCACGCTTCAAT-3'
<i>Ec.b3256.S.F</i>	5'-GGGCATATGCTGGATAAAATTGTTATTGCC-3'
<i>Ec.b3256.S.R</i>	5'-AAACTCGAGTTTTTCTGAAGACCGAGTTT-3'
<i>Ec.b3256.P244A.S.F</i>	5'-GTGGTCGAAGAAGCGGCAGCACCGGGCATTACC-3'
<i>Ec.b3256.P244A.S.R</i>	5'-GGTAATGCCCGGTGCTGCCGCTTCTTCGACCAC-3'
<i>Ec.b2297.S.F</i>	5'-GGGCATATGTCCCGTATTATTATGCTGATCC-3'
<i>Ec.b2297.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTGCTGGTGTGCAGACTGAATC-3'
<i>Ec.b2297.P678A.S.F</i>	5'-CTGATCTCCATCGGGGCGATGCTGCAGGGTATG-3'
<i>Ec.b2297.P678A.S.R</i>	5'-CATACCCTGCAGCATCGCCCCGATGGAGATCAG-3'
<i>Ec.b0903.S.F</i>	5'-GGGATTAATATGGAGCTTAATGAAAAGTTAG-3'
<i>Ec.b0903.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCATAGATTGAGTGAAGGTACG-3'

<i>Ec.b0903.P370A.S.F</i>	5'-GGTCCGTCTCCGGAAGCGAACATGACCATTCTG-3'
<i>Ec.b0903.P370A.S.R</i>	5'-CAGAATGGTCATGTTTCGCTTCCGGAGACGGACC-3'
<i>Ec.b0015.H.F</i>	5'-GCGCCATGGTGGCTAAGCAAGATTATTACG-3'
<i>Ec.b0015.H.R</i>	5'-ATTGGTACCTTAGCGGGTCAGGTCGTCAAA-3'
<i>Ec.b0438.S.F</i>	5'-GGGCATATGACAGATAAACGCAAAGATGGC-3'
<i>Ec.b0438.S.R</i>	5'-AAACTCGAGTTCACCAGATGCCTGTTGCGC-3'
<i>Ec.b4174.S.F</i>	5'-GGGCATATGGCGTGGAATCAGCCCGGTAAT-3'
<i>Ec.b4174.S.R</i>	5'-AAACTCGAGTTCCTCCCTGACGCTGGTAGTC-3'
<i>Ec.b1014.S.F</i>	5'-AAACATATGGGAACCACCACCATGGGGGTTA-3'
<i>Ec.b1014.S.R</i>	5'-AAACTCGAGACCTATAGTCATTAAGCTGGCG-3'
<i>Ec.b1189.S.F</i>	5'-GGGATTAATCGAGTTGTCATACTGGGAAGTG-3'
<i>Ec.b1189.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTGTGTGTGCGCCATGTAAATGG-3'
<i>Ec.b3764.S.F</i>	5'-AAACATATGGCGGAAAGCTTTACGACGAC-3'
<i>Ec.b3764.S.R</i>	5'-AAACTCGAGATCGTCAGAATCGGTGTAGT-3'
<i>Ec.b1440.S.F</i>	5'-GGGCATATGACAGATAAACGCAAAGATGGCTCA-3'
<i>Ec.b1440.S.R</i>	5'-AAACTCGAGTTCACCAGATGCCCTGTTGCGCTTC-3'
<i>Ec.b2294.S.F</i>	5'-AAACATATGGAAATGACCAACGCGCAACGTC-3'
<i>Ec.b2294.S.R</i>	5'-GGGCTCGAGGGCATTGATAATTTGATTAATT-3'
<i>Ec.b2803.S.F</i>	5'-GGGCATATGTTATCCGGCTATATTGCAGGAG-3'
<i>Ec.b2803.S.R</i>	5'-GGGCTCGAGCACTTCCTCTATAAATTCAGGT-3'
<i>Ec.b3538.S.F</i>	5'-GGGCATATGACTCAATTTACGCAAAATACCG-3'
<i>Ec.b3538.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTGCGGGTAAGGCACCCAGTCG-3'
<i>Ec.b2541.S.F</i>	5'-GGGCATATGAGCGATCTGCATAACGAGTCC-3'
<i>Ec.b2541.S.R</i>	5'-AAACTCGAGAAGATCCAGCCCAGCCGCTAC-3'
<i>Ec.b3310.S.F</i>	5'-GGGCATATGATCCAAGAACAGACTATGCTGA-3'
<i>Ec.b3310.S.R</i>	5'-AAACTCGAGGAGTACTTCTGGTGCCAGAGAG-3'
<i>Ec.b0524.S.F</i>	5'-GGGCATATGGCGACACTCTTTATTGCAGATC-3'
<i>Ec.b0524.S.R</i>	5'-GGGCTCGAGAAACGGAAAATGAATCAGCTCA-3'
<i>Ec.b3987.S.F</i>	5'-GGGCATATGGTTTACTCCTATACCGAGAAA-3'
<i>Ec.b3987.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTCGTCTTCCAGTTCGATGTTG-3'
<i>Ec.b0344.S.F</i>	5'-GGGATTAATATGACCATGATTACGGATTAC-3'
<i>Ec.b0344.S.R</i>	5'-AAACTCGAGTTTTTGACACCAGACCAACTGG-3'
<i>Ec.b0700.S.F</i>	5'-AAACATATGAGCGGAAAACCGGCGGCGGTCAG-3'
<i>Ec.b0700.S.R</i>	5'-GGGCTCGAGCATCACTCCGGTGAATACAAATCT-3'
<i>Ec.b0859.S.F</i>	5'-GGGATTAATCAGTGCGCACTTTACGACGCGG-3'
<i>Ec.b0859.S.R</i>	5'-AAACTCGAGTTGCTTCACCAGCAGCGTCAGC-3'

### B.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αгарόζης

Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της αгарόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100 Kb. Στον Πίνακα B.2 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αгарόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

**Πίνακας Β.2:** Συγκέντρωση πηκτικής αгарόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων.

Αγαρόζη (% w/v)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων (bp)
0.75	10.000 - 15.000
1.0	500 – 10.000
1.25	300 – 5.000
1.5	200 – 4.000
2.0	100 – 2.500
2.5	50 - 1000

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Η προετοιμασία της πηκτικής αгарόζης πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία. Αρχικά, ποσότητα αгарόζης διαλύεται σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ και 1 mM EDTA). Η συγκέντρωση της πηκτικής αгарόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογη του μεγέθους των γραμμικών μορίων που ηλεκτροφορούνταν κάθε φορά. Η φιάλη με την αгарόζη και το διάλυμα TAE θερμαίνεται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αгарόζη διαλυθεί εντελώς. Το διάλυμα κρυώνει έως ότου η θερμοκρασία του φτάσει τους 50 °C και προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,5 µg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματιστούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης. Αφού η πηκτή έχει σταθεροποιηθεί απομακρύνεται από αυτήν η «χτένα». Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνειά του. Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (0,25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% w/v κυανόλη του ξυλενίου και 30% v/v γλυκερόλη) 1/10 του όγκου του δείγματος, τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης κατάλληλη τάση ηλεκτρικού πεδίου που δεν ξεπερνά τα 5 Vcm<sup>-1</sup> και χρόνος εφαρμογής ανάλογο των δειγμάτων.

### B.3.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτική αгарόζης

Για την ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτική αгарόζης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από την εταιρία Macherey-Nagel (MN-NucleoSpin Gel and PCR Clean-up). Αρχικά, από την πηκτική αгарόζης απομονώνεται, με την χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Η απομονωμένη ζώνη τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf, ζυγίζεται και προστίθενται διπλάσιος των mg της ζώνης όγκος ρυθμιστικού διαλύματος NT (περιέχει άλατα) (για παράδειγμα για 100 mg πηκτικής αгарόζης απαιτούνται 200 µl διαλύματος NT). Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 50 °C για 5-10 λεπτά έως ότου διαλυθεί η αгарόζη. Για να διαλυθεί πλήρως, αναδεύουμε ήπια το δείγμα κάθε 2-3 λεπτά, καθ'όλη τη διάρκεια της επώασης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column και φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται το διάλυμα που εκλύεται από τη στήλη. Προστίθενται 700 µl διαλύματος NT3 (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που εκλύεται από τη στήλη απορρίπτεται. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου,

ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα NT3 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις. Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf. Για την έκλυση του DNA προστίθεται ddH<sub>2</sub>O ή 15-50 µl διαλύματος έκλυσης NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

### B.3.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου nanodrop (Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση επιλέγεται στο λογισμικό της συσκευής από τον χειριστή η ένδειξη DNA.

Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1 µl από τον εκάστοτε διαλύτη. Φωτομετρείται ποσότητα δείγματος 1 µl και λαμβάνονται οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων. Ένα δείγμα DNA θεωρείται ικανοποιητικά καθαρό όταν ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> είναι περίπου 1,8. Μικρότερες τιμές της τιμής αυτής αποτελούν ένδειξη μόλυνσης, π.χ. από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 280 nm.

Ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> αποτελεί ένα δεύτερο μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο λόγος αυτός είναι συνήθως υψηλότερος από τις αντίστοιχες τιμές του λόγου OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,8 και 2,2. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.

### B.3.6 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. Οι πέψεις των δειγμάτων DNA γίνονται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Ο καθορισμός του όγκου εξαρτάται τόσο από την ποσότητα του εκάστοτε ενζύμου περιορισμού που χρησιμοποιείται όσο και από την ποσότητα και την καθαρότητα του DNA. Η συνήθης ποσότητα κυμαίνεται μεταξύ 20-100 µl. Περιγραφή διαδικασίας: σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου και η ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA περιέχει υπολείμματα RNA προστίθεται επιπλέον και RNase A. Τέλος, προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Σε μία τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30 µl αναμειγνύονται:

Δείγμα DNA	10-20 µl (τελικής συγκέντρωσης 200-500 ng)
Ένζυμο περιορισμού	1 µl
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενδονουκλεάσης	3 µl
RNase A (1 mg/ml)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ως τελικό όγκο 30 µl

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

### B.3.7 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. Η μέθοδος που αναφέρεται παρακάτω περιγράφεται από τους Sambrook *et al.* (1989). Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3 για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδισμένων πλασμιδίων. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA ένθεσης χρησιμοποιείται ο εξής τύπος:

$(\text{ng πλασμιδιακού φορέα} * \text{kb DNA ένθεσης} / \text{kb πλασμιδιακού φορέα}) * 3 = \text{ng DNA ένθεσης}$ .

Η αραιώση τόσο του φορέα όσο και του ενθέτου DNA γίνεται ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας. Η αντίδραση ενσωμάτωσης 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.

## B.4 Μετασχηματισμός κυττάρων

### B.4.1 Δημιουργία κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό 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 18 ώρες στους 37 °C. Από τα 5 ml της καλλιέργειας χρησιμοποιούνται 2 ml για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C για 2 περίπου ώρες (O.D.<sub>600</sub> = 0,3-0,4). Οι χειρισμοί που ακολουθούν γίνονται στον πάγο ή στους 4 °C. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 25 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στροφές/λεπτό. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub>, και διατηρείται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6.000 στροφές/λεπτό. Τέλος το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 10 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v). Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες eppendorf (50-200 μl) φυλάσσονται στους -80 °C.

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

Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανών προς μετασηματισμό κυττάρων από το κατάλληλο στέλεχος *E. coli*. Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δε πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασηματισμό κυττάρων. Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επωάζεται στον πάγο για περίπου μισή ώρα. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42 °C για ένα 1-2 λεπτά και την μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο για 1 λεπτό. Προστίθενται 200 μl LB θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 1 ώρα. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C, για 15-20 ώρες.

#### B.4.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli* πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους:

##### i. Μέθοδος του βρασμού (boiling prep) (Holmes και Quilgey, 1981)

Πέντε ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχουν την κατάλληλη προσθήκη αντιβιοτικών, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες. Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνονται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν πιο στεγνό. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 150 μl διαλύματος Stet buffer (8% w/v σακχαρόζη, 0,1% v/v Triton-X100, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), παρουσία λυσοζύμης (50 mg/mL) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρωσή του στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρωση, το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται στο υπερκείμενο 180 μl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο ίζημα προστίθενται 300 μl αιθανόλης 70% v/v ώστε να ξεπλυθεί και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Έπειτα με τη βοήθεια της πιπέτας αφαιρείται η αιθανόλη και οι σωλήνες erpendorf αφήνονται ανοιχτοί ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται με 20-30 μl ddH<sub>2</sub>O και το απομονωμένο πλασμίδιο αποθηκεύεται στους -20 °C.

##### ii. Απομόνωση με στήλη (miniprep)

Για την απομόνωση με στήλη χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο 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 προσθήκη αντιβιοτικών, εμβολιάζονται με μια αποικία μετασηματισμένων με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ακολουθεί επώαση με συνεχή



ανακίνηση στους 37 °C για περίπου 16 ώρες. Από την παραπάνω καλλιέργεια 1-5 ml μεταφέρονται σε σωλήνα erppendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 250 µl διαλύματος P1(περιέχει RNase A). Προστίθενται 250 µl διαλύματος P2 (lysis buffer: 200 mM NaOH, 1% w/v SDS), το δείγμα αναδεύεται ήπια και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα λιγότερο από 5 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται επιπλέον 350 µl διαλύματος N3 (Neutralization buffer: 4,2 M GuHCl, 0,9 M KAc, pH 4.8) και αμέσως ακολουθεί ανάμιξη (6-8 φορές) και φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κολώνα QIAprep spin column. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται. Η στήλη ξεπλένεται με 750 µl ρυθμιστικό διάλυμα PE (wash/binding buffer: 5,0 M GuHCl, 30% v/v isopropanol) και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE. Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf. Για την έκλυση του DNA προστίθεται 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C.

#### **B.4.4 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα**

Για να αποθηκεύσουμε βακτηριακά κύτταρα για μεγάλα χρονικά διαστήματα αρχικά, εμβολιάζουμε με μοναδιαία αποικία το θρεπτικό μέσο, LB, το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό, ώστε να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C για 14-20 ώρες. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε αποστειρωμένο erppendorf 700µl από την προκαλλιέργεια των κυττάρων και 250 µl αποστειρωμένης γλυκερόλης. Ακολουθεί η ομογενοποίηση του μείγματος με ανακίνηση του σωληναρίου και αποθήκευση του stock γλυκερόλης στους -80 °C.

### **B.5 Βιοχημική μελέτη**

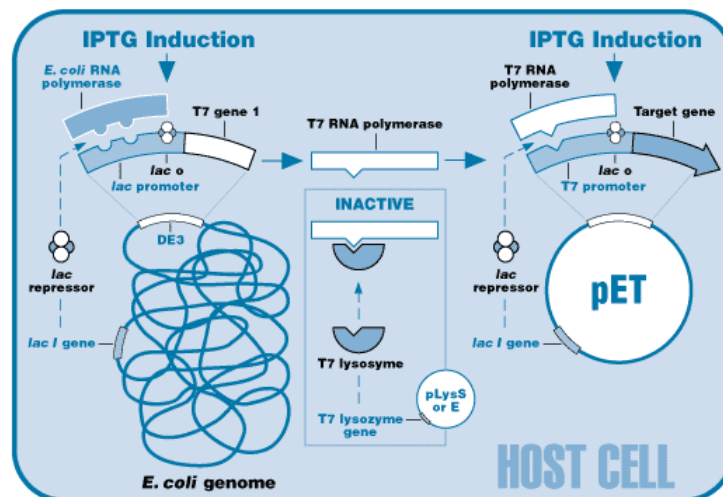
Το κεφάλαιο της βιοχημικής μελέτης περιλαμβάνει την έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα *E. coli*, την απομόνωσή τους, την ανάλυσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τέλος την μέτρηση της *in vitro* ενζυμικής τους ενεργότητας.

#### **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: *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. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού ανάλογου της

λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Το στέλεχος *E. coli* BL21 DE3, έχει Taxonomy ID: 469008.

Συγκεκριμένα, 20 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό (25 µg/ml καναμυκίνη, 25 µg/ml χλωραμφαινικόλη ή 50 µg/ml στρεπτομυκίνη), εμβολιάζονται με μοναδιαία 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, 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει την κατάλληλη δόση του αντιβιοτικού εμβολιάζεται με 10 ml από την προκαλλιέργεια. Η καλλιέργεια αφήνεται για επώαση στους 30 °C και όταν η οπτική πυκνότητα (OD<sub>600nm</sub>-Optical Density) κυμαίνεται από 0,4-0,6, προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,25 mM. Η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 30 °C για 4-6 ώρες. Έπειτα, μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης και φυγοκεντρείται σε 3.500 στροφές/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.



**Εικόνα Β.2.** Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. (<https://www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level>).

### B.5.2 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 αгарόζης είναι φορτισμένα με νικέλιο (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) στο οποίο δεσμεύεται η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη επειδή δημιουργείται σύμπλοκο ανάμεσα στο νικέλιο και το εξαεπεπίδιο ιστιδίνης.

Αρχικά, τα κύτταρα που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, επανααιρούνται 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 για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους (5 φορές για 10 δευτερόλεπτα με ενδιάμεση παύση 10 δευτερολέπτων) και φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές/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, καθαρισμός της στήλης με 4 ml διαλύματος πλύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο) ο οποίος επαναλαμβάνεται (δύο φορές). Επίσης, συλλέγονται και φυλάσσονται δύο δείγματα για ανάλυση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τη στήλη με 0,5 ml διάλυμα έκλυσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο), η διαδικασία επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές συνολικά. Τα δείγματα συλλέγονται σε τέσσερις διαφορετικούς σωλήνες erpendorf για ανάλυση SDS-PAGE.

### B.5.3 Διαδικασία Διαπίδυσης

Τα δείγματα του σταδίου της έκλυσης που περιέχουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υποβάλλονται σε διαπίδυση, συνολικά δύο φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης. Για τις ΡΡΙΑσες το διάλυμα διαπίδυσης περιέχει 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 που περιέχει 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.5.4 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 πούπεπτιδίων. Στα συστήματα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμιδίου παρουσία του δωδεκανοθειϊκού νατρίου (sodium dodecyl sulphate, SDS, [CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-O-SO<sub>3</sub> - ]Na<sup>+</sup>), ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τη μοριακή τους μάζα και όχι το φορτίο. Το SDS είναι ένα ισχυρό, αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό (αμφιφιλική ένωση) το οποίο αλληλεπιδρά ισχυρά με τα πρωτεϊνικά μόρια σε αναλογία 1,4 gr SDS / gr πρωτεΐνης (περίπου ένα μόριο SDS για κάθε δύο αμινοξέα). Επιπλέον, το ισχυρό αρνητικό φορτίο των μορίων SDS καλύπτει το φυσικό φορτίο της πρωτεΐνης, έτσι ώστε τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS αποκτούν αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Επομένως, κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή που περιέχει SDS, ο διαχωρισμός γίνεται μόνο γίνεται βάσει του μοριακού μεγέθους, εξαιτίας του φαινομένου μοριακής διήθησης κατά την κίνηση μέσα από τους πόρους της πηκτής. Τα μόρια πρωτεϊνών τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο

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 στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοιβαξης (Πίνακας Β.3).

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

		Πηκτή διαχωρισμού							Πηκτή επιστοιβαξής
		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 πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται όπως περιγράφεται ακολούθως: Τα διαλύματα 1, 2, 3, 5 και 6 αναμειγνύονται και έπειτα προστίθενται τα διαλύματα 7 και 8. Το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται αμέσως στο γυάλινο κάθετο καλούπι όπου αφήνεται να πολυμεριστεί για 30-60 λεπτά, στους 20-25°C. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, εισάγεται η πηκτή επιστοιβαξής, 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 στους 25 °C. Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοιβαξής, η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προστίθεται το SDS ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης το οποίο περιέχει 144 g/L γλυκίνη, 30 g/L Tris και 10 g/L SDS.

Πριν από την ηλεκτροφόρηση, τα πρωτεϊνικά δείγματα θερμαίνονται στους 100 °C, για 10 λεπτά αφού πρώτα αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος μετουσίωσης 2x, το οποίο περιέχει 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. Αμέσως, φυγοκεντρώνονται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού αφαιρεθεί προσεκτικά ο υποδοχέας (χτένα), τα δείγματα φορτώνονται στα κανάλια εισαγωγής των δειγμάτων και ηλεκτροφορούνται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως 110V όσο βρίσκονται στην πηκτή επιστοιβαξής και με 160V μέχρις ότου η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής διαχωρισμού.

Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης επιτυγχάνεται μετά από χρώση τους με κατάλληλα αντιδραστήρια. Η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει 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. Στη συνέχεια, η πηκτή αποχρωματίζεται με την εμβάπτισή της σε διάλυμα αποχρωματισμού το οποίο περιέχει 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.5.5 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 παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm ενώ μετά την αλληλεπίδραση το μέγιστο απορρόφησης εμφανίζεται στα 595 nm. Οπτικά η αλληλεπίδραση εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος της χρωστικής από καστανό σε γαλάζιο.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, που περιέχει 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. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος, για 20-35 λεπτά. Ακολούθως, λαμβάνεται η απορρόφηση για κάθε ένα από τα δείγματα. Η μετρούμενη απορρόφηση ακολουθεί γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης για εύρος συγκεντρώσεων 0,02-0,2 mg/ml. Για μέτρηση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων τα δείγματα θα πρέπει να αραιώνονται κατάλληλα.

Η συγκέντρωση του δείγματος σε πρωτεΐνη υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, εφαρμόζοντας τον τύπο:

$ABS = \epsilon \times d \times c$ , 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.5.6 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PpiB με την αποδιατεταγμένη μορφή των πρωτεϊνών στόχων

Για να διερευνηθεί εάν η PpiB αναγνωρίζει την αποδιατεταγμένη μορφή των πρωτεϊνών στόχων και αλληλεπιδρά μαζί τους, οι πρωτεΐνες στόχοι αποδιατάχθηκαν με 8 M ουρία και στη συνέχεια διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση τους με την κυκλοφιλίνη με χρωματογραφία συγγενείας. Αρχικά, τα κύτταρα στα οποία έχουν επαχθεί οι πρωτεΐνες-στόχοι, αφήνονται στο πάγο για 15 λεπτά και έπειτα επαναιωρούνται σε 5 ml διαλύματος B (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο) ανά gr υγρού βάρους κυττάρων. Ακολούθως, τα κύτταρα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15-60 λεπτά, ανακινώντας τα απαλά κατά διαστήματα, αποφεύγοντας τη δημιουργία αφρού. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλέγεται το υπερκείμενο και υποβάλλεται σε διαπίδωση ώστε να απομακρυνθεί η ουρία, ενώ συλλέγεται δείγμα τόσο από το υπερκείμενο όσο και από το ίζημα και φυλάσσεται για ανάλυση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Πραγματοποιείται απομόνωση της κυκλοφιλίνης με χρωματογραφία συγγενείας όπως περιγράφηκε στην παράγραφο B.5.2 με κάποιες διαφορές. Μετά την ήπια ανάδευση επί μια ώρα, στους 4°C και τοποθέτηση το υπερκείμενου της κυκλοφιλίνης σε ειδική στήλη χρωματογραφίας, το δείγμα που διαπερνά τη στήλη συλλέγεται και φυλάσσεται για ανάλυση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί, ο καθαρισμός της στήλης με 4 ml διαλύματος πλύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο) ο οποίος επαναλαμβάνεται (δύο φορές) και στη στήλη προστίθενται το υπερκείμενο της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης-στόχου. 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, καθαρισμός της στήλης με 4 ml διαλύματος πλύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο) ο οποίος επαναλαμβάνεται (δύο φορές). Επίσης, συλλέγονται και φυλάσσονται δύο δείγματα για ανάλυση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί έκλουση της ανασυνδυσμένης 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), η διαδικασία επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές συνολικά. Τα δείγματα συλλέγονται σε τέσσερις διαφορετικούς σωλήνες erpendorf για ανάλυση SDS-PAGE.

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

Η τεχνική απότυπωσης κατά Western, χρησιμοποιεί αντισώμα για να ανιχνεύσει το αντίστοιχο αντιγόνο σε μία μεμβράνη. Τα δείγματα, διαχωρίζονται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, 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 διατρέπει νερό για την αποφυγή υπερθέρμανσης.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται δύο φορές σε διάλυμα TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα TBST, το οποίο είναι διάλυμα TBS που περιέχει επιπλέον 0,5% v/v Tween 20 και 2% v/v Triton X-100, στο οποίο ξεπλένεται για μερικά δευτερόλεπτα. Έπειτα, η μεμβράνη ξεπλένεται ξανά σε διάλυμα TBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% BSA (blocking buffer) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% BSA και το αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση (1/1000 ή 1/2000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα σε διάλυμα TBST σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% BSA και το δεύτερο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση (1/5000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα σε διάλυμα TBST σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα DIG που περιέχει 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM Mg<sub>2</sub>Cl για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η

μεμβράνη επώαζεται για 10 λεπτά σε 10ml διαλύματος ανίχνευσης, το οποίο περιέχει το διάλυμα DIG και 200 ml διαλύματος BCIP/NBT, το οποίο προστίθεται χωριστά και τελευταίο, σε σκοτεινό θάλαμο. Η μεμβράνη παραμένει εμβαπτισμένη στο διάλυμα 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 Overlay αποτύπωση κατά Western (Far-Western Blot)

Η μέθοδος της overlay αποτύπωσης κατά Western (Far-Western Blot) είναι παρόμοια με τη μέθοδο αποτύπωσης κατά Western που περιγράφηκε παραπάνω. Στην τεχνική της αποτύπωσης κατά Western, ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει το αντίστοιχο αντιγόνο σε μία μεμβράνη, ενώ στην ανάλυση κατά Far-Western, μια σημασμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον εντοπισμό μιας πρωτεΐνης στόχου επί της μεμβράνης. Το δείγμα άγνωστης πρωτεΐνης-στόχου διαχωρίζεται σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και κατόπιν μεταφέρεται σε μία μεμβράνη. Μετά τη μεταφορά, χρησιμοποιείται ένα σύστημα ανίχνευσης στη μεμβράνη, ανάλογα με τη σήμανση της γνωστής πρωτεΐνης. Εάν η σημασμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-στόχο τότε η δεύτερη εμφανίζεται στη μεμβράνη.

Συγκεκριμένα, μετά τη μεταφορά των δειγμάτων (πρωτεϊνών-στόχων) στη μεμβράνη που πραγματοποιείται όπως περιγράφηκε παραπάνω, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται δύο φορές σε διάλυμα TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα TBST, το οποίο είναι διάλυμα TBS που περιέχει επιπλέον 0,5% v/v Tween 20 και 2% v/v Triton X-100, στο οποίο ξεπλένεται για μερικά δευτερόλεπτα. Έπειτα, η μεμβράνη ξεπλένεται ξανά σε διάλυμα TBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% BSA (blocking buffer) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται 1ml δείγματος σημασμένης πρωτεΐνης σε 9 ml διαλύματος TBS που περιέχει 1% BSA για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% BSA και το αντίσωμα για τον His επίτοπο σε κατάλληλη αραιώση (1/1000 ή 1/2000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα σε διάλυμα TBST σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% BSA και το δεύτερο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1/5000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα σε διάλυμα TBST σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα DIG που περιέχει 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM Mg<sub>2</sub>Cl για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, η μεμβράνη επώαζεται για 10 λεπτά σε 10 ml διαλύματος ανίχνευσης, το οποίο περιέχει το διάλυμα DIG και 200 ml διαλύματος BCIP/NBT, το οποίο προστίθεται χωριστά και τελευταίο, σε σκοτεινό θάλαμο. Η μεμβράνη παραμένει εμβαπτισμένη στο διάλυμα 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.5.9 Προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡΪάσης

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡΪάσης των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μια μέθοδο, κατά την οποία συνθετικά πεπτίδια της μορφής Suc-AXaaPF-pNA (succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilides), παρουσία των ΡΡΪασών, ισομερειώνονται γρηγορότερα στην *trans* διαμόρφωση. Η *trans*

διαμόρφωση αναγνωρίζεται επιλεκτικά από τη χυμοθρυψίνη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερου νιτροανιλιδίου, η συσσώρευση του οποίου μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά (Kofron et al., 1991).

Το διάλυμα πεπτιδίου (Suc-AXaaPF-pNA) αρχικής συγκέντρωσης 5 mM, τοποθετείται σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 4 °C. Σε ένα 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). Απευθείας, μέσα στο μίγμα αυτό αναμιγνύεται ο κατάλληλος όγκος του προς εξέταση πρωτεϊνικού διαλύματος (ανάλογα με τη συγκέντρωση η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford), ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 1 ml. Ακολουθεί καλή και γρήγορη ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά στην κυβέττα η οποία περιέχει το συνθετικό πεπτίδιο. Η ενεργότητα PPIάσης μετρήθηκε με την παρακολούθηση της απορρόφησης στα 390 nm στους 4°C, σε φασματοφωτόμετρο HITACHI U-2800, για 10 δευτερόλεπτα περίπου. Παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των PPIάσων λαμβάνονται τα κινητικά δεδομένα και υπολογίζεται η κλίση της ευθείας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ενζύμων και του ρυθμού κατάλυσης της αντίδρασης. Η προσθήκη πρωτεΐνης BSA δεν επηρέασε την ενεργότητα PPIάσης των πρωτεϊνών.

#### **B.5.10 Επίδραση της ενεργότητας PPIάσης παρουσία πρωτεϊνών στόχων**

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας PPIάσης, παρουσία πρωτεϊνών στόχων, πραγματοποιήθηκε με την ίδια μέθοδο της πέψης με χυμοθρυψίνη, της *trans* διαμόρφωσης συνθετικών πεπτιδίων της μορφής Suc-AXaaPF-pNA (succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilides). Με αυτή τη μέθοδο, προσδιορίζεται *in vitro* η ενεργότητα της PPIάσης των μελετούμενων PPIάσων, απουσία και παρουσία ισομοριακής συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης στόχου.

Συγκεκριμένα, το διάλυμα πεπτιδίου (Suc-AXaaPF-pNA) αρχικής συγκέντρωσης 5 mM, τοποθετείται σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 4 °C. Σε ένα 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). Απευθείας, μέσα στο μίγμα αυτό αναμιγνύεται ο κατάλληλος όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος PPIάσης (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. Ακολουθεί καλή και γρήγορη ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά στην κυβέττα η οποία περιέχει το συνθετικό πεπτίδιο. Η ενεργότητα PPIάσης μετρήθηκε με την παρακολούθηση της απορρόφησης στα 390 nm στους 4 °C, σε φασματοφωτόμετρο HITACHI U-2800, για 10 δευτερόλεπτα περίπου. Τα κινητικά δεδομένα και η κλίση της ευθείας υπολογίζονται όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

#### **B.5.11 Προσδιορισμός της ενεργότητας τσαπερόνης**

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας τσαπερόνης των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998). Η μέθοδος βασίζεται 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.



Η συνθάση του κιτρικού οξέος, της οποίας η τελική συγκέντρωση είναι ίση με 0,25  $\mu\text{M}$ , τοποθετείται μέσα σε κυβέττα εντός του φασματοφωτόμετρου στους 45 °C . Σε ένα erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 40 mM Hepes pH 7.5 με τον κατάλληλο όγκο της μελετούμενης πρωτεΐνης, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 1 ml. Ακολουθεί καλή και γρήγορη ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά στην κυβέττα η οποία περιέχει τη συνθάση του κιτρικού οξέος. Η συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος μετρήθηκε με την παρακολούθηση της αύξησης της θολότητας στα 500 nm σε φασματοφωτόμετρο HITACHI U-2800, για 20 λεπτά. Η καταγεγραμμένη μεταβολή στην απορρόφηση οφείλεται στην αύξηση της σκέδασης του φωτός έπειτα από τη συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η προσθήκη πρωτεΐνης BSA δεν επηρέασε τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος.

### **B.5.12 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας ATPάσης**

Η ενζυμική ενεργότητα ATPάσης τόσο της DnaK όσο και της AccC προσδιορίστηκε μέσω της υδρόλυσης του ATP, σύμφωνα με την μέθοδο των Blanchard et al.1999. Ο ρυθμός υδρόλυσης του ATP από την AccC απουσία βιοτίνης μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά (Blanchard et al., 1999). Η παραγωγή του ADP συζεύχθηκε με την πυροσταφυλική κινάση και τη γαλακτική αφυδρογονάση και η οξείδωση του NADH παρακολούθηθηκε στα 340 nm.

Συγκεκριμένα, σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 37°C τοποθετείται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 10 units κινάσης του πυροσταφυλικού (pyruvate kinase), 18 units γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate dehydrogenase), 0,5 mM φωσφοενολοπυροσταφυλικού (phosphoenolpyruvate, PEP), 0,2 mM NADH, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM ATP, 15 mM όξινου ανθρακικού καλίου (potassium bicarbonate) και 100 mM Hepes pH 8.0. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης και κατάλληλος όγκος DnaK ή AccC αντίστοιχα (ανάλογα με τη συγκέντρωση η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford), ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 0,8 ml. Ακολουθεί καλή και γρήγορη ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά στην κυβέττα χαλαζία, όπου και λαμβάνονται οι τιμές της απορρόφησης της αντίδρασης στα 340 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας των DnaK και AccC παρουσία της κυκλοφιλίνης PpiB, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστίθενται μέσα στο erpendorf και 10x γραμμομοριακή περίσσεια κυκλοφιλίνης έναντι της DnaK και AccC, αντίστοιχα. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας και η λήψη των τιμών της απορρόφησης της αντίδρασης στα 340 nm. Τέλος, για τον υπολογισμό της ενεργότητας της DnaK παρουσία της DnaJ και της κυκλοφιλίνης PpiB, ακολουθείται η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω με τη διαφορά ότι προστίθενται μέσα στο erpendorf και ισομοριακή ποσότητα της πρωτεΐνης DnaJ έναντι της DnaK. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας και η λήψη των τιμών της απορρόφησης της αντίδρασης στα 340 nm.

### **B.5.13 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας φωσφορικής ακετυλομεταφοράς της Pta**

Η ενζυμική ενεργότητα φωσφορικής ακετυλομεταφοράς της Pta προσδιορίστηκε στην κατεύθυνση δημιουργίας του ακέτυλο-CoA της αντίδρασης (forward direction) σύμφωνα με την μέθοδο των Lawrence and Ferry, 2006. Ο ρυθμός κατάλυσης της αντίδρασης προς την κατεύθυνση δημιουργίας του ακέτυλο-CoA από την Pta, μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά. Ο σχηματισμός ή η υδρόλυση του δεσμού θειοεστέρα του ακέτυλο-CoA παρακολούθηθηκε με μεταβολή στην απορρόφηση στα 233 nm.

Συγκεκριμένα, σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 35 °C τοποθετείται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 20 mM KCl και το κατάλληλο υπόστρωμα. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης και κατάλληλος όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος Pta (ανάλογα με τη συγκέντρωση η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford), ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 0,8 ml. Οι αντιδράσεις ξεκίνησαν με την προσθήκη του δεύτερου υποστρώματος όπως περιγράφεται από τους Lawrence and Ferry, 2006. Αφού ακολούθησε καλή και γρήγορη ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά στην κυβέττα χαλαζία, ελήφθησαν οι τιμές της απορρόφησης της αντίδρασης στα 233 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της Pta παρουσία της κυκλοφιλίνης PpiB, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστίθενται μέσα στο erpendorf και 10x γραμμομοριακή περίσσεια κυκλοφιλίνης έναντι της Pta. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας και η λήψη των τιμών της απορρόφησης της αντίδρασης στα 233 nm. Θεωρήθηκε η κλίση της ευθείας γραμμής, ως η ταχύτητα της αντίδρασης (min<sup>-1</sup>).

#### **B.5.14 Προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας GTPάσης της FtsZ**

Η ενζυμική ενεργότητα GTPάσης της FtsZ προσδιορίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Ingeman and Nunnari, 2005. Αποτελεί μια συζευγμένη μέθοδο όπου το GTP συνεχώς αναγεννάται από το GDP μέσω του ενζύμου κινάση του πυροσταφυλικού, χρησιμοποιώντας φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) σαν υπόστρωμα. Σε αυτή την αντίδραση, η κινάση του πυροσταφυλικού παράγει πυροσταφυλικό, το οποίο, με τη σειρά του, ανάγεται σε γαλακτικό μέσω του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση και ταυτόχρονα χρησιμοποιεί το NADH ως συνυπόστρωμα του πυροσταφυλικού. Η εξάντληση του NADH μετρήθηκε με παρακολούθηση της απορρόφησης στα 340 nm.

Συγκεκριμένα, σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 30 °C τοποθετείται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PEP, 0,6 NADH, 20 units κινάσης του πυροσταφυλικού (pyruvate kinase), 20 units γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate dehydrogenase), κατάλληλη συγκέντρωση GTP (0,1-0,5 mM) και ισομοριακή συγκέντρωση MgSO<sub>4</sub>. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης και κατάλληλος όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος FtsZ (ανάλογα με τη συγκέντρωση η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford), ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 0,8 ml. Αφού ακολούθησε καλή και γρήγορη ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά στην κυβέττα χαλαζία, ελήφθησαν οι τιμές της απορρόφησης της αντίδρασης στα 340 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της FtsZ παρουσία της κυκλοφιλίνης PpiB, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστίθενται μέσα στο erpendorf και 10x γραμμομοριακή περίσσεια κυκλοφιλίνης έναντι της FtsZ. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας και η λήψη των τιμών της απορρόφησης της αντίδρασης στα 340 nm.

#### **B.6 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PpiB με την καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA με τη μέθοδο SPLIT-GFP**

Η αλληλεπίδραση της PpiB με την AccC αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SPLIT-GFP σύμφωνα με την οποία οπτικοποιούνται πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μέσω της φθορίζουσας συμπληρωματικότητας. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι μια τροποποιημένη εκδοχή των Wilson et al., 2004.

Η Prib συντήχθηκε με το N-τελικό άκρο της GFP πρωτεΐνης και η AccC συντήχθηκε με το C-τελικό άκρο της GFP πρωτεΐνης. Τα δύο χωριστά πολυπεπίδια συν-εκφράστηκαν χρησιμοποιώντας το φορέα pCDFDuet-1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, μεταφέρουν τις κατάλληλες θέσεις περιορισμού για τη σύνδεση με τον φορέα έκφρασης pCDFDuet-1 και παρατίθενται στον Πίνακα Β.4. Τα πολυπεπίδια της GFP πρωτεΐνης, κλωνοποιήθηκαν μεταξύ των αντιστοιχών θέσεων του φορέα pCDFDuet-1, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του Prib.GFP<sub>N</sub>-AccC.GFP<sub>C</sub>.pCDFDuet-1. Για τις αντιδράσεις ελέγχου κατασκευάστηκε το πλασμίδιο GFP<sub>N</sub>-GFP<sub>C</sub>.pCDFDuet-1. Η απουσία ανεπιθύμητων μεταβολών ελέγχθηκε με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η συν-έκφραση της Prib με την AccC με τη μέθοδο της SPLIT-GFP πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) με την προσθήκη IPTG.

Η μικροσκοπική παρατήρηση έγινε σε κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) που εκφράζουν τις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες. Τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν προήλθαν από αποικίες τριβλίων με 0.25mM IPTG. Τα τριβλία επωάζονται για 15-20 ώρες περίπου στους 30 °C και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα λαμβάνονται από τις αναπτυγμένες αποικίες των τρυβλίων χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη σπάτουλα και επαναδιαλύονται σε 200 μl ddH<sub>2</sub>O ώστε να τοποθετηθούν στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Το δείγμα των κυττάρων τοποθετείται σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με ένα λεπτό στρώμα 2% w/v αγαρόζης και απευθείας καλύπτονται με μια καλυπτρίδα (Rines et al., 2011) όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο Β.11. Η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω της ανίχνευσης της ακτινοβολίας που παράγεται από μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα (Olympus BX-50).

Με σκοπό τη ποσοτικοποίηση του φθορισμού με τη χρήση φθορομέτρου, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες από τα κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) που τις εκφράζουν και στα διαλυτά κλάσματα που προέκυψαν μετρήθηκε η ακτινοβολία που παράγεται με τη χρήση φθορομέτρου. Τα κύτταρα προήλθαν από αποικίες τριβλίων με 0,25 mM IPTG, που επωάζονται για 15-20 ώρες περίπου στους 30 °C και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες (Wilson et al., 2004). Στη συνέχεια τα κύτταρα λαμβάνονται από τις αναπτυγμένες αποικίες των τρυβλίων χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη σπάτουλα, επαναιωρούνται σε 500 μl διαλύματος που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 8.0 και 300 mM NaCl. Φυγοκεντρώνονται στις 6.000 στροφές/λεπτό και επαναιωρούνται σε 1,5 mL διαλύματος λύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο). 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 φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά, στους 4 °C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και μετρείται η ακτινοβολία που παράγεται χρησιμοποιώντας το φθοροόμετρο Turner Quantech Digital Filter Fluorometer.

**Πίνακας B.4:** Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των πλασμιδίων.

Όνομα Εκκινήτη	Νουκλεοτιδική αλληλουχία Εκκινήτων
N GFP <sub>His</sub> .PCDF.F	5'-GGGGAATTCAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC-3'
N GFP <sub>His</sub> .PCDF.R	5'-AAAGAGCTCTTGTCTGCTGCCGTGATGTA-3'
C GFP <sub>Stag</sub> .PCDF.F	5'-GGGGATATCGAATGGAAATCAAAGCTAAC-3'
C GFP <sub>Stag</sub> .PCDF.R	5'-AAAGGTACCTTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'
N GFP-PpiB <sub>His</sub> .PCDF.F	5'-GGGAAGCTTTGGTTACTTTCCACACCAATCAC-3'
N GFP-PpiB <sub>His</sub> .PCDF.R	5'-AAGCGCCGCTTACTCGCTAACGGTCACGCT-3'
AccC-C GFP <sub>Stag</sub> .PCDF.F	5'-GGGAGATCTGGATTAAATTGTTATTGCCAAC-3'
AccC-C GFP <sub>Stag</sub> .PCDF.R	5'-GGGAGATCTTTTCTGAAGACCGAGTTT-3'

### B.7 Μελέτη της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Για τη μελέτη της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης αρχικά εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό (25 µg/ml καναμυκίνη, 25 µg/ml χλωραμφαινικόλη, 50 µg/ml στρεπτομυκίνη ή 25 µg/ml αμπικιλίνη), με μια αποικία, είτε των μεταλλαγμένων στελεχών που μελετήθηκαν είτε μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BW25113 με τους εκάστοτε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες (overnight). Έπειτα, 2 µl της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό της επιφάνειας στερεού θρεπτικού μέσου LB (swarming τρυβλίο) που περιέχει 0,5% "Fluka" άγαρ, 1% Bacto-tryptone, 0,5% Yeast Extract, 1% NaCl και 0,5% w/v γλυκόζη το καθένα, περιέχει επίσης την κατάλληλη προσθήκη των αντιβιοτικών και IPTG τελικής συγκέντρωσης 0 έως 0,5 mM. Για τη διερεύνηση της κολυμβητικής κίνησης ακολουθείται η ίδια διαδικασία, ωστόσο διαφοροποιείται. Αναλυτικά, 2 µl καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό ενός ημιστερεού θρεπτικού μέσου LB (swimming τρυβλίο) που περιέχει άγαρ με τελική συγκέντρωση 0,3% "Fluka" άγαρ, 1% Bacto-tryptone, 0,5% Yeast Extract, 1% NaCl, περιέχει επίσης την κατάλληλη προσθήκη των αντιβιοτικών και IPTG τελικής συγκέντρωσης 0 έως 0,5 mM. Ο εμβολιασμός και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιείται στο κέντρο των τρυβλίων. Τα τρυβλία μετά την παρασκευή ξηραίνονται για 1-2 ώρες πριν εμβολιαστούν, επωάζονται για 20 ώρες στους 30 °C και αμέσως μετά σαρώνονται με ανάλυση 600 dpi σε συνηθισμένο σαρωτή εγγράφων. Η διερεύνηση της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης προήλθε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, ανά στέλεχος. Ο υπολογισμός του εμβαδού που καταλαμβάνει η εκάστοτε αναπτυσσόμενη αποικία πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r και μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>).

### B.8 Μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση

Τα κύτταρα λαμβάνονται 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 µl ddH<sub>2</sub>O, ώστε να διευκολυνθεί η διασπορά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιούνται πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες, περνώντας

αυτές πάνω από τη φλόγα 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.

Ακόμα, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά έπειτα από χρώση DAPI κατά την οποία χρωματίζεται το DNA με τη χρωστική 4',6-diamidino-2-phenylindole. Το μονιμοποιημένο παρασκεύασμα διαβρέχεται με 100 μl τελικής συγκέντρωσης 5 μg/ml διαλύματος 4',6-diamidino-2-phenylindole. Στη συνέχεια εφαρμόζεται πάνω στο παρασκεύασμα μια καλυπτρίδα και ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

## B.9 Μελέτη του σχηματισμού βιοϋμενίου

Αρχικά, για τη διερεύνηση του σχηματισμού βιοϋμενίου, εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό (25 μg/ml καναμυκίνη, 25 μg/ml χλωραμφαινικόλη ή 25 μg/ml αμπικιλίνη), με μια αποικία είτε των μεταλλαγμένων στελεχών που μελετήθηκαν είτε μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli* BW25113 με τους εκάστοτε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στους 30 °C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες. Σε ειδικούς σωλήνες erpendorf τοποθετούνται 495 μl 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 μl από την κάθε καλλιέργεια και ακολουθεί καλή ανάδευση. Σε μια ειδική πλάκα πολυστυρενίου (microtiter dish) που περιέχει 96 εσοχές φόρτωσης, πηγαδάκια (wells), τοποθετούνται 100 μl από τα παράπανω δείγματα καλλιεργειών σε κάθε πηγαδάκι. Έπειτα εφαρμόζεται μια αυτοκόλλητη ταινία και το καπάκι της πλάκας. Οι πλάκες επωάζονται για 20 ώρες στους 30 °C. Με τη βοήθεια πιπέτας απομακρύνεται με προσοχή από κάθε εσοχή της πλάκας η αναπτυσσόμενη καλλιέργεια και τοποθετείται σε κυβέττα, αφού έχουν προστεθεί σε αυτήν 900 μl υγρού θρεπτικού υλικού LB, ώστε να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD<sub>600nm</sub>-Optical Density). Αφού διαπιστωθεί η σωστή 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 μl της χρωστικής crystal violet (0,1% w/v) η οποία παραμένει για 20-30 λεπτά. Ακολουθεί πλύση των πλακών με πολλαπλή ήπια εμβάπτιση σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα της χρωστικής crystal violet από τις εσοχές. Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα τα οποία έχουν σχηματίσει βιοϋμένιο βρίσκονται προσκολλημένα σε κάθε εσοχή και έχουν χρωματιστεί με τη χρωστική crystal violet. Οι πλάκες έπειτα αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, σε κάθε εσοχή προσθέτονται 200 μl διαλύματος AA (80% καθαρή αιθανόλη και 20% ακετόνη) και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Από κάθε εσοχή, με τη χρήση πιπέτας, απομακρύνεται το διάλυμα, τοποθετείται σε κυβέττα η οποία περιέχει 800 μl του διαλύματος AA και λαμβάνονται οι τιμές της οπτικής πυκνότητας στα 550 nm (OD<sub>550nm</sub>-Optical Density) (O'Toole and Kolter, 1998).

### **B.10 Διερεύνηση της συμμετοχής των πρωτεϊνών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης**

Για την μελέτη της επιβίωσης των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriC*, *ΔrriD*, *ΔsurA*, *ΔrriA* και *ΔrriB* σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (25 μg/ml), με μια αποικία των μεταλλαγμένων στελεχών. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στους 30 °C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες. Στη συνέχεια, 5 μl των ίδιων καλλιιεργειών διαφόρων αραιώσεων ( $10^{-1}$  έως  $10^{-6}$ ) εμβολιάζονται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB και επωάζονται για 20 ώρες στους 42 °C. Τα τρυβλία σκανάζονται και η ανάπτυξη του κάθε στελέχους συγκρίνεται με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113.

Αντίστοιχα, για την εξέταση της επιβίωσης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία του εμβολιασμού των προκαλλιιεργειών, 5 μl των ίδιων καλλιιεργειών διαφόρων αραιώσεων ( $10^{-1}$  έως  $10^{-6}$ ) εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB το οποίο σε αυτή την περίπτωση περιείχε 2% και 5% w/v χλωριούχο νάτριο. Έπειτα από επώαση 20 ωρών στους 30 °C, τα τρυβλία σκαναρίστηκαν και η ανάπτυξη του κάθε στελέχους συγκρίθηκε με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113.

### **B.11 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών με GFP επίτοπο και με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης (phase contrast).**

Αρχικά για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών που φέρουν τον GFP επίτοπο, εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό (25 μg/ml καναμυκίνη, 25 μg/ml χλωραμφαινικόλη), με μια αποικία είτε μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BW25113 είτε των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriC* και *ΔrriB*, 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 προκαλλιιεργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 20 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό (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 έως ότου εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή η οπτική πυκνότητα ( $OD_{600nm}$ -Optical Density) να κυμαίνεται από 0,4-0,5. Ακόμα, δείγμα κυττάρων από την καλλιέργεια για παρατήρηση, λαμβάνεται και την επόμενη ημέρα όπου η καλλιέργεια έχει εισέλθει στη στατική φάση ανάπτυξης. Ενώ, δείγμα κυττάρων λαμβάνεται και από το άκρο της αναπτυσσόμενης *swarming* αποικίας χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη σπάτουλα, τα κύτταρα αυτά επαναδιαλύονται σε 200 μl ddH<sub>2</sub>O ώστε να τοποθετηθούν στις αντικειμενοφόρους πλάκες. Το δείγμα κυττάρων κάθε καλλιέργειας τοποθετείται σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με ένα λεπτό στρώμα 2% w/v αгарόζης (σε ddH<sub>2</sub>O) (Rines et al., 2011). Συγκεκριμένα, στην επιφάνεια της κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας, τοποθετούνται περίπου 500 μl διαλύματος 2% w/v αгарόζης, αμέσως η αντικειμενοφόρος πλάκα καλύπτεται με μια άλλη ώστε να σχηματιστεί ένα λεπτό και λείο στρώμα αгарόζης. Αφού κρυώσει και στερεοποιηθεί αφαιρείται η επάνω αντικειμενοφόρος και τοποθετούνται επάνω στο στερεό στρώμα αгарόζης 100 μl κυττάρων από κάθε καλλιέργεια τα οποία καλύπτονται απευθείας με μια καλυπτρίδα. Η παρατήρηση των κυττάρων με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης (phase contrast) και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών με GFP επίτοπο πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα (Olympus BX-50).

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**





## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1 Οι παρβουλίνες του *E.coli*

Τα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών απαντώνται σε όλους τους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Στο μικροοργανισμό *E.coli*, μέσω της αναζήτησης στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του, εντοπίζονται τρία γονίδια που κωδικοποιούν για παρβουλίνες. Πρόκειται για τα γονίδια *surA* (b0053/JW0052), *pprD* (b0441/JW0431) και *pprC* (b3775/JW3748).

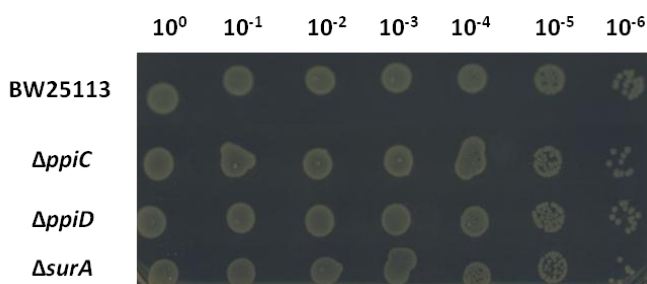
Προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των παρβουλινών αποκτήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου μοντέλου *Escherichia coli*, που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις παρβουλίνες *surA*, *pprD*, *pprC* και μελετήθηκε ο φαινότυπός τους σε συνθήκες καταπόνησης, σε συνθήκες ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια (*Swarming*), κίνησης σε ημί-στερεό μέσο (*Swimming*) και σε συνθήκες βιοϋμενίου (*Biofilm*). Τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη λοιπόν είναι τα  $\Delta surA$ ,  $\Delta pprD$  και  $\Delta pprC$ .

Τα στελέχη *E. coli*, BW25113 (BW25113: *rrnB3*  $\Delta lacZ4787$  *hsdR514*  $\Delta(araBAD)567$   $\Delta(rhaBAD)568$  *rph-1*) και όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ελήφθησαν από το Stock Center *E. coli* Genetic.

#### Γ.1.1 Διερεύνηση της συμμετοχής των παρβουλινών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης

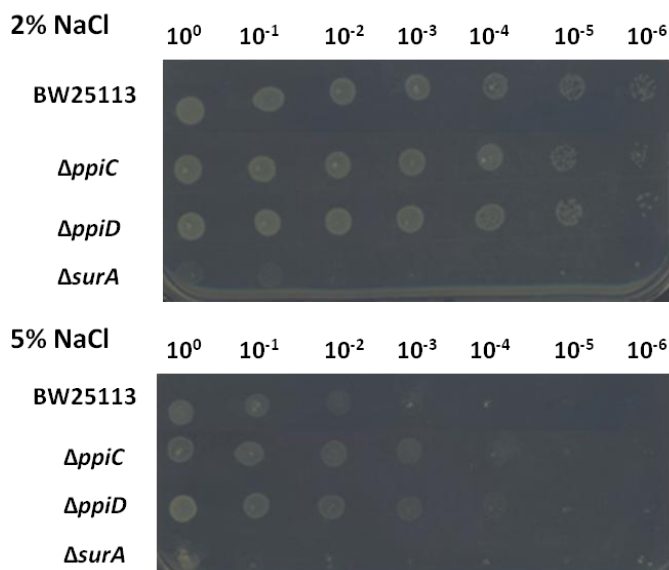
Για να διερευνηθεί η συμμετοχή των παρβουλινών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη  $\Delta surA$ ,  $\Delta pprD$  και  $\Delta pprC$  και εξετάστηκαν ως προς την επιβίωσή τους σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (42 °C) και υψηλής αλατότητας (2% και 5% NaCl). Για την μελέτη της επίδρασης στην ανάπτυξη των στελεχών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, τα στελέχη αφού αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση, στη συνέχεια εμβολιάστηκαν 5  $\mu$ l καλλιέργειας του κάθε στελέχους αντίστοιχα, διαφόρων αραιώσεων ( $10^{-1}$  έως  $10^{-6}$ ) στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB. Τα τριβλία επώαστηκαν για 20 h στους 42 °C (Εικόνα Γ.1.1). Αντίστοιχα, για την μελέτη της επίδρασης στην ανάπτυξη των στελεχών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία εμβολιασμού στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB το οποίο σε αυτή την περίπτωση περιείχε 2% και 5% w/v χλωριούχο νάτριο. Τα τριβλία επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C (Εικόνα Γ.1.2). Η ανάπτυξη του κάθε στελέχους συγκρίθηκε με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113.

#### Επώαση 42°C



**Εικόνα Γ.1.1.** Η επίδραση υψηλής θερμοκρασίας (42°C) στην επιβίωση του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriC*, *ΔrriD* και *ΔsurA*. Η φωτογραφία απεικονίζει την ανάπτυξη του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο LB έπειτα από επώαση 20 h, στους 42 °C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.1., διαπιστώνεται ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔrriC*, *ΔrriD* και *ΔsurA* παρουσιάζουν σχετικά την ίδια ικανότητα επιβίωσης, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ελαφρώς μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου παρουσιάζουν μόνο στη δεκαδική αραιώση  $10^{-6}$ , επομένως συμπεραίνεται ότι οι παρβουλίνες πιθανώς δε συμμετέχουν στην απόκριση του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης.



**Εικόνα Γ.1.2.** Η επίδραση της υψηλής αλατότητας στην επιβίωση του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriC*, *ΔrriD* και *ΔsurA*. 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 20 h, στους 30 °C.

Από την Εικόνα Γ.1.2. παρατηρείται ότι η επιβίωση των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriC*, *ΔrriD* και *ΔsurA* διαφέρει ελάχιστα από αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Ωστόσο, διακρίνεται ότι το στέλεχος *ΔsurA* παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, αφού για τη συνθήκη 2% αλατότητας μετά την  $10^{-2}$  αραιώση δεν παρατηρείται ανάπτυξη ενώ για τη συνθήκη 5% αλατότητας δεν παρατηρείται ανάπτυξη σε καμία αραιώση παρά μόνο στο πυκνό. Επίσης, παρατηρείται ότι τα στελέχη *ΔrriC* και *ΔrriD* παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι παρβουλίνες πιθανώς συμμετέχουν με διαφορετικό τρόπο στην απόκριση του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

### Γ.1.2 Τα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών επηρεάζουν την κινητικότητα των βακτηρίων και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων

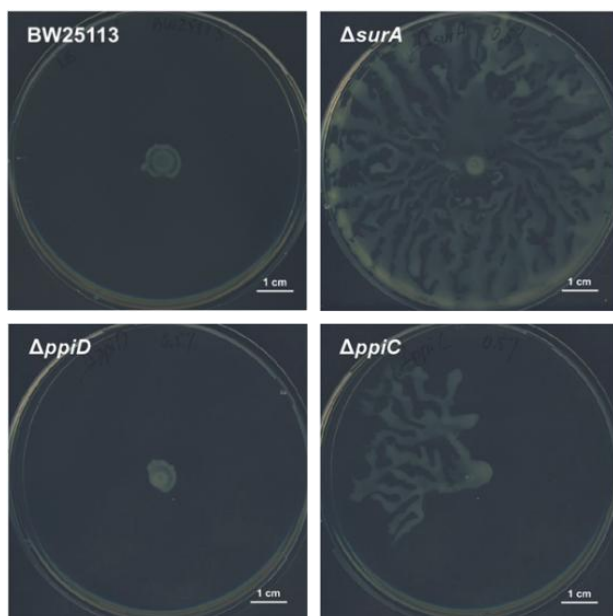
Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, όπου πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση 3.985 γονιδίων του μικροοργανισμού *E. coli* και χαρακτηρισμός του φαινοτύπου του κάθε στελέχους σε συνθήκες ομαδικής

κίνησης σε επιφάνεια (*swarming* τρυβλία), βρέθηκε ότι 216 εξ αυτών εμπλέκονται στο συγκεκριμένο φαινότυπο. Η σάρωση υπέδειξε ότι γονίδια που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα εμπλέκονται, μεταξύ άλλων, στον κύκλο του Krebs, στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στη μεταγωγή σήματος και στη βιοσύνθεση λιποσακχαριτών ή ότι κωδικοποιούν για τσαπερόνες ή για πρωτεΐνες αναδίπλωσης όπως οι ΡΡΙΑσες (Inoue et al., 2007).

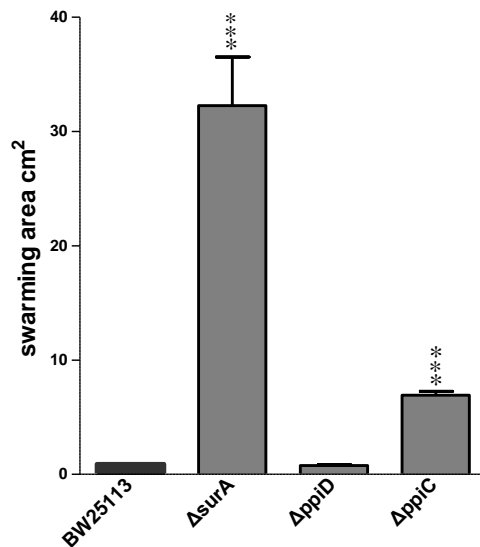
Τα μέλη της οικογένειας των ΡΡΙΑσών αλλά και οι τσαπερόνες, πιθανότατα έμμεσα, επηρεάζουν την κινητικότητα του βακτηρίου *E.coli*, καθώς αναδιπλώνουν ή αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν ενεργά στο μηχανισμό της κινητικότητας (Inoue et al., 2007). Έτσι, προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των παρβουλινών στη λειτουργία και στην κινητικότητα του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη  $\Delta surA$ ,  $\Delta rpiD$  και  $\Delta rpiC$  και χαρακτηρίστηκε ο φαινότυπός τους σε συνθήκες ομαδικής κίνησης (*swarming*), κολυμβητικής κίνησης (*swimming*) και σε συνθήκες βιοϋμενίου (*biofilm*).

### Γ.1.2.1 Ικανότητα ομαδικής κίνησης (*swarming*) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών

Ο ρόλος των παρβουλινών στην ικανότητα ομαδικής κίνησης στο βακτήριο *E. coli* διερευνήθηκε μέσω της ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta surA$ ,  $\Delta rpiD$  και  $\Delta rpiC$  σε τρυβλία *swarming*. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώτη στατική φάση και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν 2 μl στην επιφάνεια τρυβλίων που περιείχαν θρεπτικό υλικό LB εμπλουτισμένο με 0,5% (w/v) γλυκόζη και 0,5% (w/v) συγκέντρωσης σε άγαρ (Εικόνα Γ.1.3.). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C, στη συνέχεια μετρήθηκε η επιφάνεια που κατέλαβε ο βακτηριακός πληθυσμός και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους για ομαδική κίνηση (Εικόνα Γ.1.4.).



**Εικόνα Γ.1.3.** Αντιπροσωπευτικά πρότυπα ομαδικής κίνησης του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta surA$ ,  $\Delta rpiD$  και  $\Delta rpiC$ , έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C.

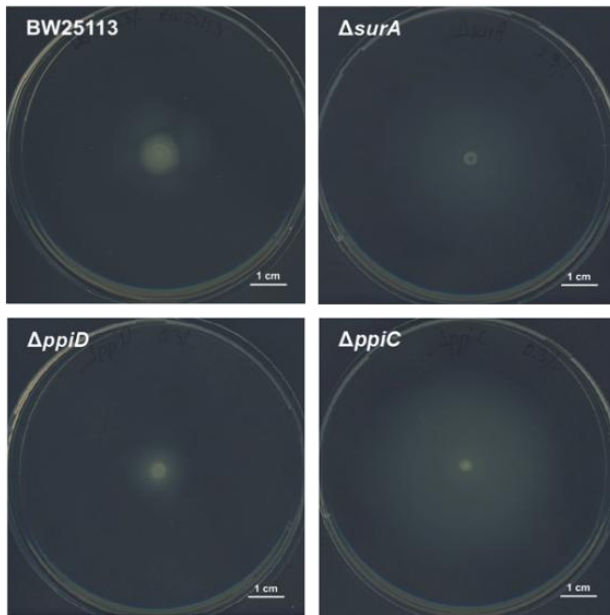


**Εικόνα Γ.1.4.** Εμβαδόν επιφάνειας του πληθυσμού του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔsurA*, *ΔpriD* και *ΔpriC* σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46f. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Unpaired t Test ( $P < 0,05$ ).

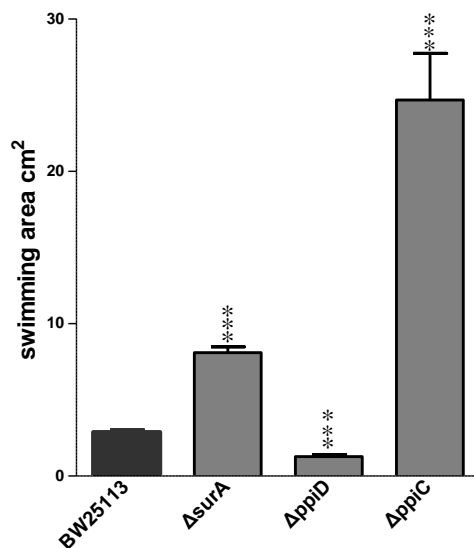
Διαπιστώνεται ότι, τα στελέχη που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες SurA και PriC εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ομαδικής κίνησης σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα στέλεχη *ΔsurA* και *ΔpriC* αναπτύχθηκαν, σε τετραγωνικά εκατοστά, σχεδόν τριάντα και τέσσερις φορές αντίστοιχα περισσότερο από το στέλεχος αγρίου τύπου, σημειώνοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα Γ.1.4.). Αντίθετα, το *ΔpriD* στέλεχος επέδειξε τη μικρότερη ικανότητα ομαδικής κίνησης συγκριτικά με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη της οικογένειας, αφού ο φαινότυπος του δε διέφερε από του αγρίου τύπου. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις, συμπεραίνεται ότι οι παρβουλίνες SurA και PriC εμπλέκονται στην ομαδική κίνηση σε επιφάνεια ρυθμίζοντάς την αρνητικά (*negative regulators*), ενώ η παρβουλίνη PriD πιθανώς δεν εμπλέκεται σε αυτήν.

#### Γ.1.2.2 Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης (*swimming*) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών

Για να διερευνηθεί ο ρόλος των παρβουλινών στην ικανότητα κολυμβητικής κίνησης στο βακτηρίο *E. coli* μέσω της ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔsurA*, *ΔpriD* και *ΔpriC* σε τρυβλία *swimming*. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν 2 μl στην επιφάνεια τρυβλίων που περιείχαν θρεπτικό υλικό LB και 0,3% (w/v) συγκέντρωσης σε άγαρ (Εικόνα Γ.1.5.). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C, στη συνέχεια μετρήθηκε η επιφάνεια που κατέλαβε ο βακτηριακός πληθυσμός και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46f ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους για κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.1.6.).



**Εικόνα Γ.1.5.** Αντιπροσωπευτικά πρότυπα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔsurA*, *ΔprpD* και *ΔprpC*, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C.



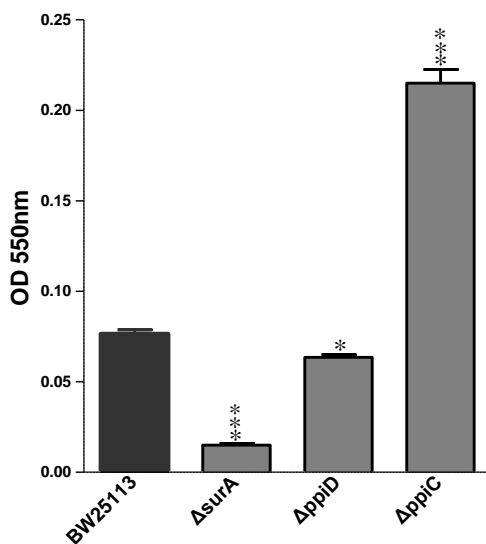
**Εικόνα Γ.1.6.** Εμβαδόν επιφάνειας του πληθυσμού του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔsurA*, *ΔprpD* και *ΔprpC* σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 του Unpaired t Test (P<0,05).

Στην Εικόνα Γ.1.6. παρατηρείται ότι τα στελέχη που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες SurA και PrpC εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *ΔpriC* εμφανίζει τη μεγαλύτερη κολυμβητική κίνηση, σχεδόν δέκα φορές μεγαλύτερη από την κινητικότητα του στελέχους αγρίου τύπου, ενώ το στέλεχος *ΔsurA* σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη από αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Τέλος, το στέλεχος *ΔpriD* εμφανίζει τη μικρότερη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης συγκριτικά (Unpaired t Test) με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη της οικογένειας αλλά και κατά δύο φορές μικρότερη σε σύγκριση με την κινητικότητα του στελέχους αγρίου τύπου. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεραίνεται ότι οι παρβουλίνες SurA και PpiC εμπλέκονται στη κολυμβητική κίνηση ρυθμίζοντάς την αρνητικά εφόσον απουσία τους η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης αυξάνεται, ενώ η παρβουλίνη PpiD εμπλέκεται στη κολυμβητική κίνηση ρυθμίζοντάς την θετικά εφόσον απουσία της η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης μειώνεται.

### Γ.1.2.3 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (*biofilm*) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών

Η μελέτη του ρόλου των παρβουλινών στο σχηματισμό βιοϋμενίου του βακτηρίου *E.coli* διερευνήθηκε μέσω της ανάπτυξης του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις παρβουλίνες, σε συνθήκες βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση και στην συνέχεια αραιώθηκαν 1:100 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και 100 μl επώστηκαν σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.1.7.).

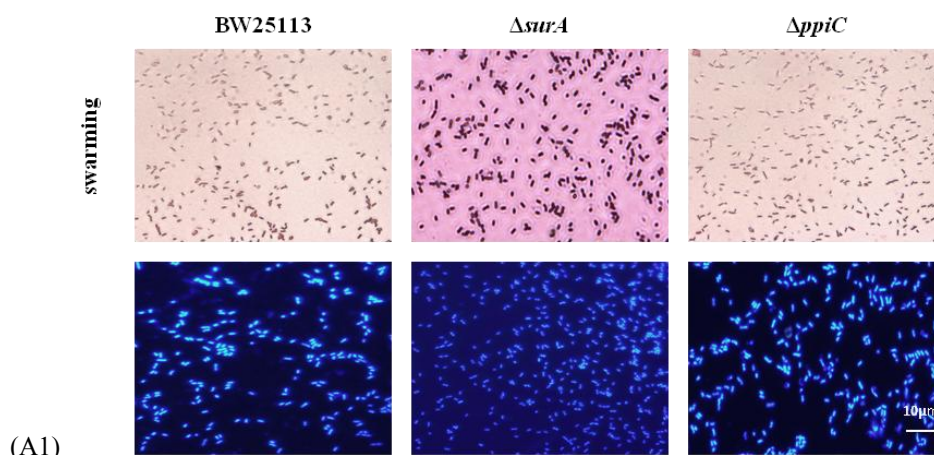


**Εικόνα Γ.1.7.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔsurA*, *ΔpriD* και *ΔpriC*, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και Unpaired t Test ( $P < 0,05$ ).

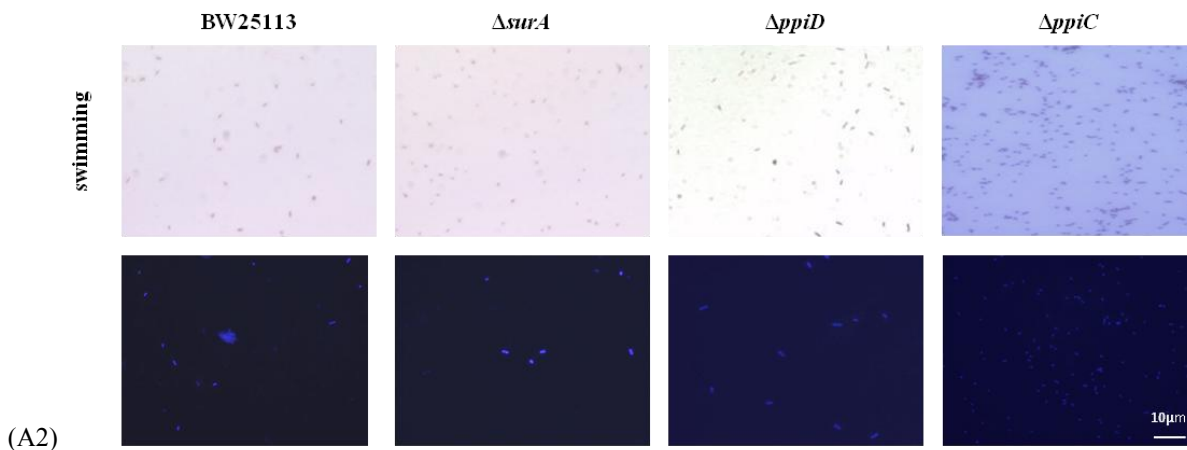
Παρατηρείται ότι το στέλεχος που φέρει απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη PprC εμφανίζει αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.1.7.). Συγκεκριμένα, το στέλεχος *ΔppiC* εμφανίζει τη μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερη από την ικανότητα του στελέχους αγρίου τύπου. Ακόμα, το στέλεχος *ΔsurA* και το στέλεχος *ΔppiD* εμφανίζει λίγο μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί ότι το στέλεχος *ΔsurA* εμφανίζει τη μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου συγκριτικά (Unpaired t Test) με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη της οικογένειας αλλά και κατά πέντε φορές μικρότερη ικανότητα σε σύγκριση με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι η παρβουλίνη PprC επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου ρυθμίζοντάς την αρνητικά, ενώ η παρβουλίνη PprD και κυρίως η παρβουλίνη SurA φαίνεται ότι πιθανώς αποτελούν θετικούς ρυθμιστές της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, αφού η απουσία τους προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

#### Γ.1.2.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση

Αρκετοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι παρουσιάζουν την ικανότητα της ομαδικής κίνησης, μεταβάλλουν τη μορφολογία τους σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης δηλαδή εμφανίζουν μια κυτταρική επιμήκυνση (Verstraeten et al., 2008). Προκειμένου να διαπιστωθεί η οποιαδήποτε μεταβολή της κυτταρικής μορφολογίας, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των παρβουλινών με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Τα μεταλλαγμένα στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν (2 μl) στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επώαστηκαν επί διάστημα στους 30 °C για 20 h. 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 πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, κατά την οποία χρωματίζεται το κυτταρικό τοίχωμα με τις χρωστικές κρυσταλλικό 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.







**Εικόνα Γ.1.8.** Κυτταρική μορφολογία του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta surA$  και  $\Delta ppiC$  κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (A1) και των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta surA$ ,  $\Delta ppiD$  και  $\Delta ppiC$  κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (A2) έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Από την Εικόνα Γ.1.8., διαπιστώνεται ότι η κυτταρική μορφολογία των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta surA$  και  $\Delta ppiC$ , κατά την ομαδική κίνηση όσο και των στελεχών  $\Delta surA$ ,  $\Delta ppiD$  και  $\Delta ppiC$  κατά την κολυμβητική κίνηση, είναι παρόμοια με αυτή του στελέχους αγρίου τύπου.

Η κυτταρική μορφολογία του στελέχους  $\Delta ppiD$  δεν εξετάστηκε κατά την ομαδική κίνηση, αφού το μεταλλαγμένο στέλεχος της PpiD παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση.

### Γ.1.3 Η συμμετοχή της ενεργότητας PPIάσης και της ενεργότητας τσαπερόνης των παρβουλινών στην κινητικότητα και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli*

Στη συνέχεια, με σκοπό να αποσαφηνίσουμε το μηχανισμό της δράσης των παρβουλινών τόσο στην κινητικότητα όσο και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, διερευνήθηκε εάν η ενεργότητα PPIάσης αυτών των ενζύμων είναι απαραίτητη για τους παρατηρούμενους φαινότυπους. Έτσι, δημιουργήθηκαν στελέχη τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο κάθε παρβουλίνης και στην πορεία ελέγχθηκε εάν αυτά τα στελέχη συμπληρώνουν τα αντίστοιχα στελέχη  $\Delta ppiC$ ,  $\Delta ppiD$  και  $\Delta surA$  στις μελετούμενες συνθήκες.

#### Γ.1.3.1 Κατασκευή κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο PPIάσης των παρβουλινών

Βιβλιογραφικά εντοπίστηκαν αμινοξέα που μετέχουν στο ενεργό κέντρο PPIάσης της κάθε παρβουλίνης (Kühlewein et al., 2004; Malesevic et al., 2010). Για την παρβουλίνη PpiD δεν κατασκευάστηκε κατευθυνόμενη σημειακή μετάλλαξη αφού βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι δε διαθέτει σημαντική ενεργότητα PPIάσης (Weininger et al., 2010). Αφού εντοπίστηκαν, κατασκευάστηκαν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων που μετέχουν στον ενεργό κέντρο PPIάσης των δύο παρβουλινών. Τα αμινοξέα λυσίνη στη θέση 293 της SurA και κυστεΐνη στη θέση 41 της PpiC αντικαταστάθηκαν με το αμινοξύ αλανίνη. Για τη σημειακή μετάλλαξη στο πιθανό ενεργό κέντρο PPIάσης των παρβουλινών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SOE. Τα μεταλλαγμένα γονίδια που προέκυψαν



κλωνοποιήθηκαν είτε στον φορέα pPROEX.HTa είτε στον pCDFDuet-1, αφού προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους ώστε να πιστοποιηθεί η επιτυχής μετάλλαξη για την κάθε πρωτεΐνη.

### Γ.1.3.2 Η παρβουλίνη SurA

#### Γ.1.3.2.1 Ενζυμική ενεργότητα της SurA

Η ανίχνευση της ενεργότητας PPIάσης των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μια μέθοδο, κατά την οποία συνθετικά πεπτίδια της μορφής Suc-AXaaPF-pNA (succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilides), παρουσία των PPIασών, ισομερειώνονται γρηγορότερα στην *trans* διαμόρφωση. Η *trans* διαμόρφωση αναγνωρίζεται επιλεκτικά από τη χυμοθρυψίνη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερου νιτροανιλιδίου, η συσσώρευση του οποίου μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά (Kofron et al., 1991). Επίσης, η διερεύνηση της ενεργότητας τσαπερόνης των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα 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 στα 500 nm.

Αρχικά, η υπερέκφραση των γονιδίων *surA* και *surA<sub>K293A</sub>* πραγματοποιήθηκε με χρήση των πλασμιδίων *surA<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa και *surA<sub>K293AHis</sub>*-pPROEX.HTa, με προσθήκη 0,25 mM IPTG, σε κύτταρα *E.coli* BL21DE3. Οι πρωτεΐνες SurA και SurA<sub>K293A</sub> φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους. Η απομόνωση των διαλυτών πρωτεϊνών SurA και SurA<sub>K293A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας.

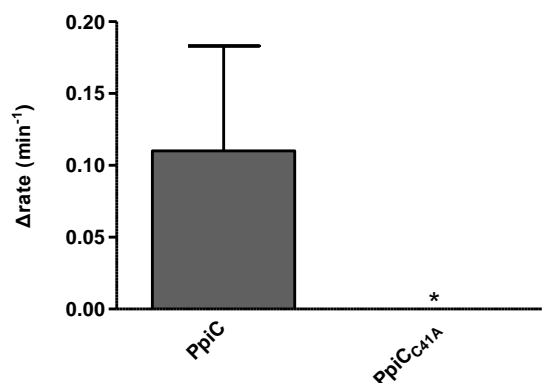
Η ανίχνευση τόσο της ενεργότητας της PPIάσης όσο και της ικανότητας παρεμπόδισης δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, των ανασυνδυασμένων SurA και SurA<sub>K293A</sub> δεν κατέστη δυνατή. Η πρωτεΐνη SurA<sub>K293A</sub> δεν εκφραζόταν σε επαρκή ποσότητα ώστε να μπορέσει να ανιχνευθεί με βεβαιότητα η ενζυμική της ενεργότητα.

### Γ.1.3.3 Η παρβουλίνη PpiC

#### Γ.1.3.3.1 Ενζυμική ενεργότητα της PpiC

Αρχικά πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της ενεργότητας PPIάσης της PpiC και της μεταλλαγμένης PpiC<sub>C41A</sub> (Εικόνα Γ.1.9.). Η υπερέκφραση των γονιδίων *ppiC* και *ppiC<sub>C41A</sub>* πραγματοποιήθηκε με χρήση των πλασμιδίων *ppiC<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa και *ppiC<sub>C41AHis</sub>*-pPROEX.HTa, με την προσθήκη 0,25 mM IPTG, σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Οι κυτταροπλασμικές πρωτεΐνες PpiC και PpiC<sub>C41A</sub> φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους. Η απομόνωση των διαλυτών πρωτεϊνών PpiC και PpiC<sub>C41A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Η ανίχνευση της ενεργότητας της PPIάσης των ανασυνδυασμένων PpiC και PpiC<sub>C41A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Leu, λευκίνη), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών PpiC και PpiC<sub>C41A</sub>.

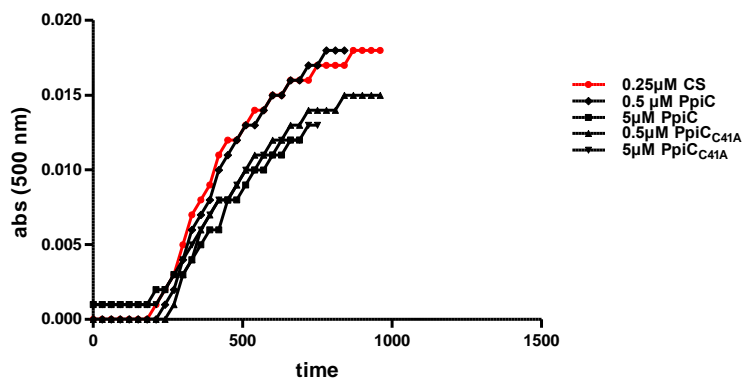
Όπως διαπιστώνεται και από το διάγραμμα της Εικόνας Γ.1.9, η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη PpIC<sub>C41A</sub> παρουσίασε μείωση της ενεργότητας PPIάσης σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε σχέση με την ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου PpIC.



**Εικόνα Γ.1.9.** Η ενεργότητα PPIάσης των PpIC και PpIC<sub>C41A</sub>. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τουλάχιστον τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0, μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε εάν η σημειακή μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο PPIάσης επηρεάζει την ενεργότητα τσαπερόνης της, παρεμποδίζοντας τη δημιουργία 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 πιθανότατα έχει ενεργότητα τσαπερόνης. Η πορεία δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά στα 500 nm.

Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο πρωτεΐνες PpIC και PpIC<sub>C41A</sub> δεν παρεμποδίζουν σε ιδιαίτερα μεγάλο βαθμό τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (5 μM). Η PpIC μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαίνεται να έχει ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS ενώ η PpIC<sub>C41A</sub> παρουσιάζει την ίδια ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS και για τις δύο συγκεντρώσεις. Συμπερασματικά, η σημειακή μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο PPIάσης της PpIC<sub>C41A</sub> δεν επηρεάζει τη δραστηριότητά της ως παρεμποδιστή της συσσωμάτωσης της CS και πιθανότατα τη λειτουργία της ως τσαπερόνη.



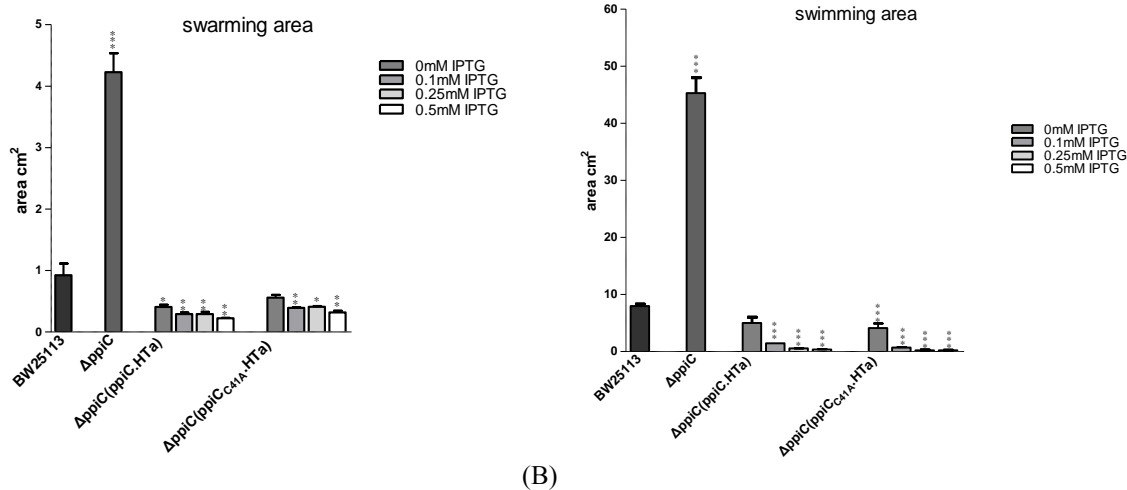
**Εικόνα Γ.1.10.** Η επίδραση των πρωτεϊνών PpiC και PpiC<sub>C41A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0,25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0,5 μM της PpiC (◆), 5 μM της PpiC (■), 0,5 μM της PpiC<sub>C41A</sub> (▲) και 5 μM της PpiC<sub>C41A</sub> (▼). Η συνθάση του κιτρικού οξέος επωάστηκε στους 45 °C. Η συσσωμάτωση παρακολούθηθηκε με τη μέτρηση της θολότητας του διαλύματος στα 500 nm, απουσία και παρουσία πρόσθετων ενζύμων.

#### Γ.1.3.3.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους *ΔppiC* στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια *priC* και *priC<sub>C41A</sub>*

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η απουσία της ενεργότητας PPIάσης αποτελεί τον λόγο όπου το στέλεχος *ΔppiC* παρουσιάζει τους συγκεκριμένους φαινότυπους στις συνθήκες ομαδικής κίνησης, κολυμβητικής κίνησης και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, το *ΔppiC* στέλεχος μετασχηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *priC<sub>His</sub>-pPROEX.HTα* και *priC<sub>C41AHis</sub>-pPROEX.HTα* με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη *ΔppiC(priC)* και *ΔppiC(priC<sub>C41A</sub>)*, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο φαινότυπος των νέων αυτών στελεχών στις τρεις συνθήκες μελέτης.

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών *ΔppiC(priC)* και *ΔppiC(priC<sub>C41A</sub>)*, παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια μετρήθηκε η επιφάνεια που κατέλαβε ο βακτηριακός πληθυσμός και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους για ομαδική και κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ1.11.A, Εικόνα Γ1.11.B).



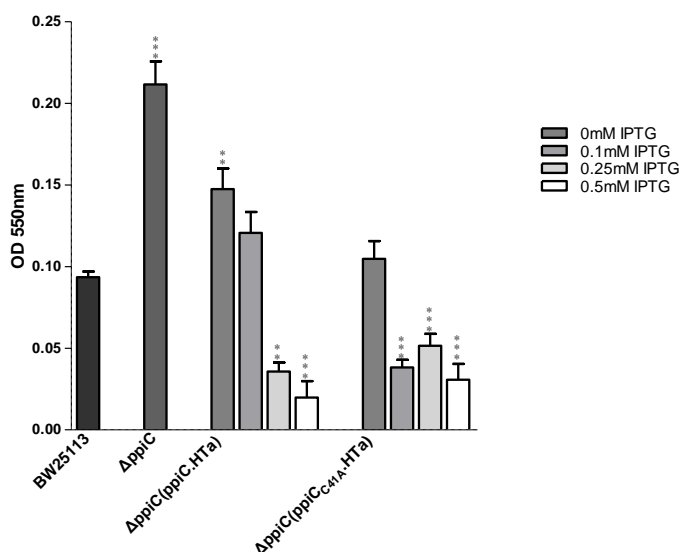
**Εικόνα 11.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113 και  $\Delta priC$  καθώς και των στελεχών  $\Delta priC(priC)$  και  $\Delta priC(priC_{C41A})$ , σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $cm^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46g. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

Από το διάγραμμα της Εικόνας Γ.1.11.A διαπιστώνεται ότι η υψηλή ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta priC$  μειώνεται λόγω της έκφρασης του γονιδίου  $priC$  στο στέλεχος  $\Delta priC(priC)$  αλλά και του γονιδίου  $priC_{C41A}$  στο στέλεχος  $\Delta priC(priC_{C41A})$  σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG, ακόμα και απουσία του, το οποίο οφείλεται στα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου  $priC$  και  $priC_{C41A}$  αντίστοιχα λόγω της αναγνώρισης του *trc* προαγωγέα από ενδογενείς RNA πολυμεράσες (*leaky transcription*) (Agnoli et al., 2006). Επίσης η έκφραση τόσο του γονιδίου  $priC$  όσο και του  $priC_{C41A}$  στο στέλεχος  $\Delta priC$  μειώνουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης σε χαμηλότερα επίπεδα από το στέλεχος αγρίου τύπου. Συμπερασματικά, η P*riC* είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου της ομαδικής κίνησης ενώ φαίνεται ότι η ενεργότητα P*riC* δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της ομαδικής κίνησης.

Επίσης, τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.11.B έδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων  $priC$  και  $priC_{C41A}$  στο στέλεχος  $\Delta priC$  προκαλεί μείωση της κολυμβητικής κίνησης σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά του στελέχους αγρίου τύπου πιθανώς λόγω της υπερσυσσώρευσης των πρωτεϊνών αυτών. Η αυξημένη κολυμβητική κίνηση του  $\Delta priC$  στελέχους υποχωρεί σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά του στελέχους αγρίου τύπου από την έκφραση των γονιδίων  $priC$  και  $priC_{C41A}$  στα στελέχη  $\Delta priC(priC)$  και  $\Delta priC(priC_{C41A})$  αντίστοιχα. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η αυξημένη βιοσύνθεση της P*riC* είναι υπεύθυνη για τη μείωση της κολυμβητικής κίνησης του στελέχους  $\Delta priC$  και την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου, ενώ η ενεργότητα P*riC* πιθανότατα δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της κολυμβητικής κίνησης.

## Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Κατά αναλογία και προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η ενεργότητα ΡΡΪάσης της ΡριC είναι ο λόγος όπου το στέλεχος *ΔρριC* παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, εξετάστηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *ρριC* και *ρριC<sub>C41A</sub>* στο στέλεχος *ΔρριC* επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *ΔρριC(ρριC)* και *ΔρριC(ρριC<sub>C41A</sub>)* αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση και στην συνέχεια αραιώθηκαν 1:100 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και 100 μl επώαστηκαν σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.1.12.).



**Εικόνα Γ.1.12.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔρριC* καθώς και των στελεχών *ΔρριC(ρριC)* και *ΔρριC(ρριC<sub>C41A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

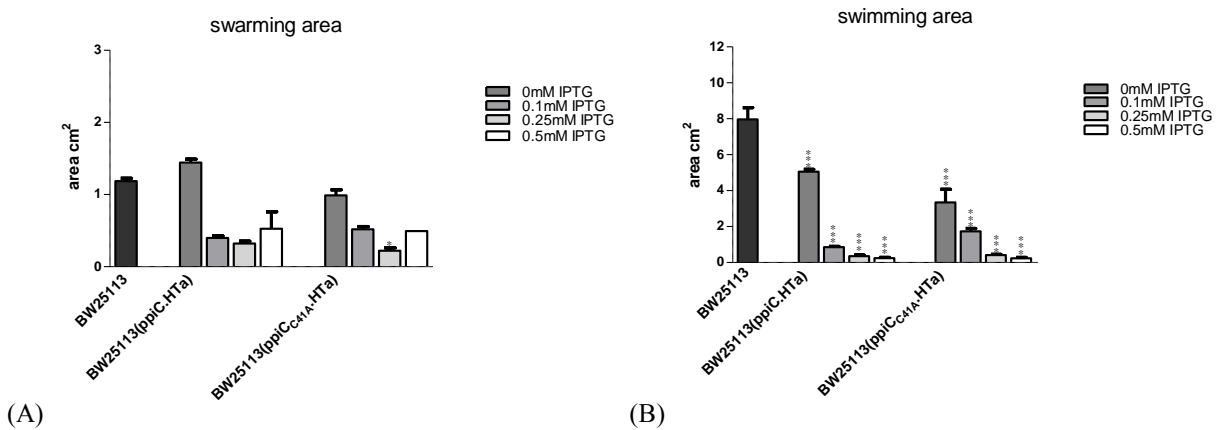
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.12. συμπεραίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *ρριC* προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔρριC(ρριC)*. Δηλαδή η παρουσία της πρωτεΐνης ΡριC επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις IPTG (0.1 mM) ενώ στις υψηλότερες παρατηρούμε ότι η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου υποχωρεί σε μικρότερα επίπεδα από αυτά του στελέχους αγρίου τύπου. Διαπιστώνεται ότι ο λόγος της υψηλής ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔρριC* είναι η απουσία του γονιδίου *ρριC*. Επίσης, παρατηρείται ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *ρριC<sub>C41A</sub>* προκαλεί εξίσου μικρότερα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου από αυτά του στελέχους αγρίου τύπου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις IPTG. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ΡριC είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου και η ενεργότητα ΡΡΪάσης της ΡριC δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της ΡριC ως αρνητικού ρυθμιστή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

### Γ.1.3.3.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου στο οποίο υπερέκφράζονται τα γονίδια *priC* και *priC<sub>C41A</sub>*

Στη συνέχεια, εξετάστηκε και ο φαινότυπος του στελέχους αγρίου τύπου όταν υπερέκφράζονται σε αυτό τα γονίδια *priC* και *priC<sub>C41A</sub>*. Για το σκοπό αυτόν, το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113 μετασχηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *priC<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa και *priC<sub>C41AHis</sub>*-pPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*priC*) και BW25113(*priC<sub>C41A</sub>*), αντίστοιχα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο φαινότυπος αυτών των στελεχών στις τρεις συνθήκες μελέτης.

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113(*priC*) και BW25113(*priC<sub>C41A</sub>*), παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα του βακτηριακού πληθυσμού *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.1.13.A και Εικόνα Γ.1.13.B).



**Εικόνα Γ.1.13.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113, BW25113(*priC*) και BW25113(*priC<sub>C41A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0,05).

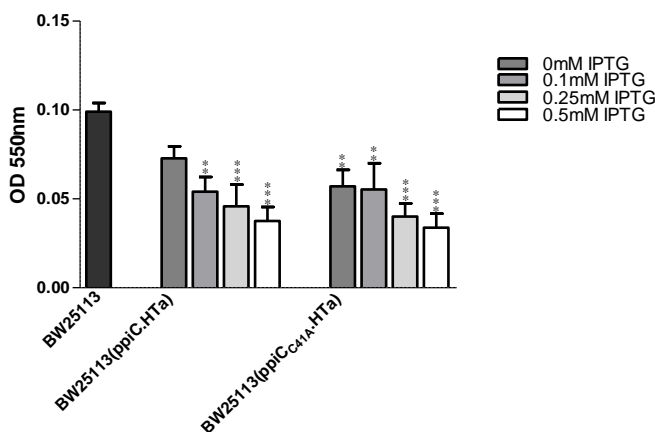
Από την Εικόνα Γ.1.13.A, παρατηρείται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *priC* όπως και η υπερέκφραση του γονιδίου *priC<sub>C41A</sub>* στο στέλεχος BW25113 φαίνεται να μην προκαλούν σημαντική μεταβολή του φαινοτύπου της ομαδικής κίνησης σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Έτσι συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡΙάσης της πρωτεΐνης P*riC* πιθανότητα δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της P*riC* ως αρνητικού ρυθμιστή της ομαδικής κίνησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.13.B φαίνεται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *priC* στο στέλεχος BW25113, σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG, προκαλεί μια στατιστικά (Dunnett's

Multiple Comparison Test) σημαντική μείωση της κολυμβητικής κίνησης σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα, χαμηλότερα από τα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό επαναλαμβάνεται και κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *ppiC<sub>C41A</sub>*, όπου η αυξημένη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης PpiC<sub>C41A</sub> (0 έως 0,5 mM IPTG) στο στέλεχος BW25113(*ppiC<sub>C41A</sub>*), προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας της κολυμβητικής κίνησης. Επομένως, η σχετικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *ppiC* φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση ή καταστολή της κολυμβητικής κίνησης του στελέχους BW25113 ανεξάρτητα από την ενεργότητα ΡΡΙάσης της πρωτεΐνης PpiC υποδεικνύοντας επιπλέον ότι η PpiC αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της κολυμβητικής κίνησης. Προφανώς, ένα συγκεκριμένο επίπεδο πρωτεΐνης PpiC είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της ενεργότητας της ΡΡΙάσης στο σχηματισμό βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*ppiC*) και BW25113(*ppiC<sub>C41A</sub>*), λόγω της υπερέκφρασης των γονιδίων *ppiC* και *ppiC<sub>C41A</sub>*. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*ppiC*) και BW25113(*ppiC<sub>C41A</sub>*), παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Στη συνέχεια η ικανότητα τους συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.1.14.).



**Εικόνα Γ.1.14.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*ppiC*) και BW25113(*ppiC<sub>C41A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h, στους 30°C. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0.05$ ).

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.14. φαίνεται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *ppiC* στο στέλεχος BW25113, σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG, προκαλεί μια στατιστικά σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα, χαμηλότερα από τα

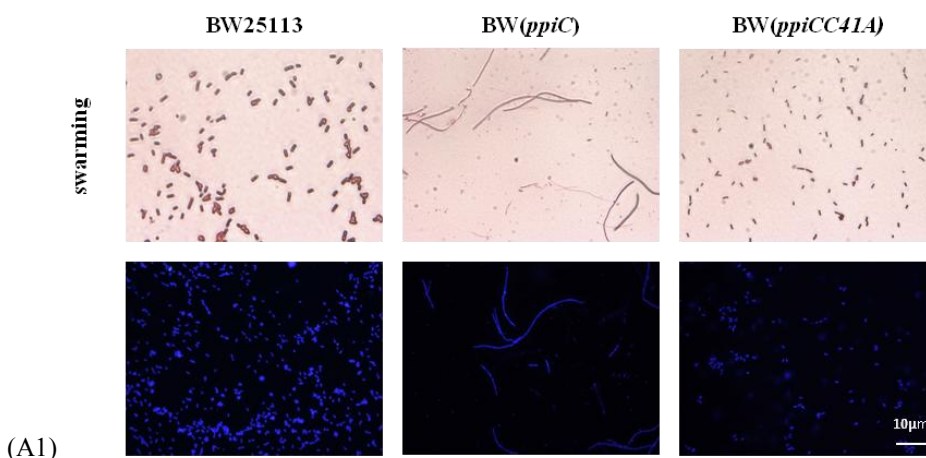


επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό επαναλαμβάνεται και κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *pprC<sub>C41A</sub>*, όπου η αυξημένη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης PprC<sub>C41A</sub> (0 έως 0,5 mM IPTG) στο στέλεχος BW25113(*pprC<sub>C41A</sub>*), προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου υποδεικνύοντας επιπλέον ότι η PprC αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του σχηματισμού βιοϋμενίου. Προφανώς, ένα συγκεκριμένο επίπεδο πρωτεΐνης PprC είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

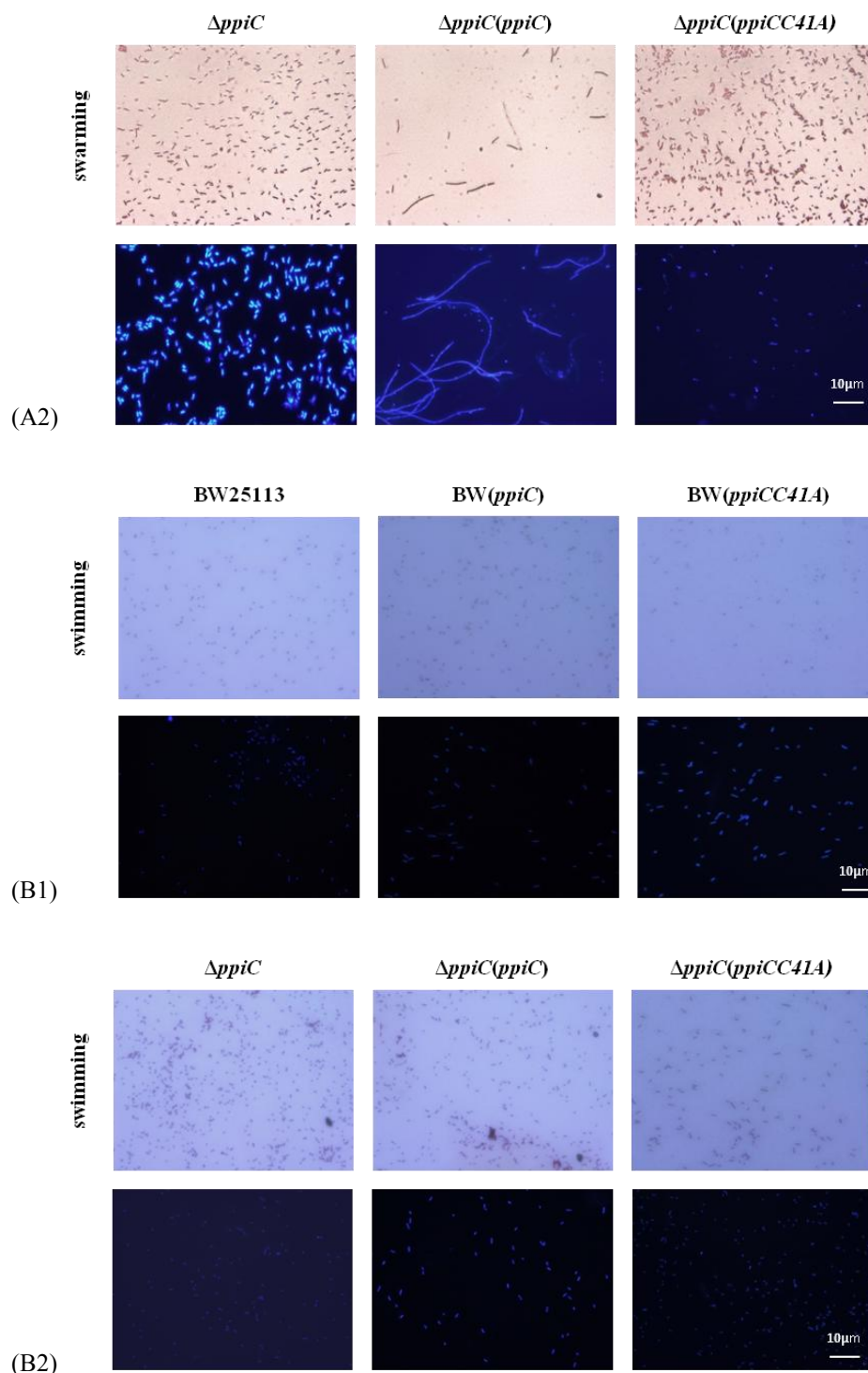
#### Γ.1.3.3.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113(*pprC*), BW25113(*pprC<sub>C41A</sub>*) και $\Delta$ *pprC*(*pprC*), $\Delta$ *pprC*(*pprC<sub>C41A</sub>*) κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*pprC*), BW25113(*pprC<sub>C41A</sub>*),  $\Delta$ *pprC*(*pprC*) και  $\Delta$ *pprC*(*pprC<sub>C41A</sub>*), με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική κίνηση και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδίων *pprC<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa και *pprC<sub>C41AHis</sub>*-pPROEX.HTa πραγματοποιήθηκε με προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0 έως 0,5 mM. Τα παραπάνω στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν (2  $\mu$ l) στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επωάστηκαν στους 30 °C επί διάστημα 20 h. 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 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.1.15. ενδεικτικά παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*pprC*), BW25113(*pprC<sub>C41A</sub>*),  $\Delta$ *pprC*,  $\Delta$ *pprC*(*pprC*) και  $\Delta$ *pprC*(*pprC<sub>C41A</sub>*) έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *pprC* και *pprC<sub>C41A</sub>* από 0,25 mM IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.







**Εικόνα Γ.1.15:** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*priC*), BW25113(*priC<sub>C41A</sub>*),  $\Delta priC$ ,  $\Delta priC(priC)$  και  $\Delta priC(priC_{C41A})$  κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (A1), (A2) αντίστοιχα και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (B1), (B2) αντίστοιχα, έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Στην Εικόνα Γ.1.15.A1 παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*priC*), BW25113(*priC<sub>C41A</sub>*) και στην Εικόνα Γ.1.15.A2 η κυτταρική μορφολογία των στελεχών  $\Delta priC$ ,  $\Delta priC(priC)$  και  $\Delta priC(priC_{C41A})$ , έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης

των γονιδίων *pprC* και *pprC<sub>C41A</sub>* σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG, κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram και DAPI. Διακρίνεται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *pprC* τόσο στο στέλεχος BW25113(*pprC*) όσο και στο στέλεχος  $\Delta$ *pprC*(*pprC*), προκαλεί μια έντονη κυτταρική μεταβολή, κατά την οποία φαίνεται να έχει ανασταλεί η κυτταρική διαίρεση. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του γονιδίου *pprC* δημιουργεί επιμηκυσμένα κύτταρα τα οποία σχηματίζουν πολλαπλά πυρηνοειδή. Η κυτταρική μορφολογία αλλάζει στα στελέχη BW25113 και  $\Delta$ *pprC*, όταν υπερεκφράζεται το μεταλλαγμένο γονίδιο *pprC<sub>C41A</sub>*, όπου τα κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία, παρόμοια με την αντίστοιχη του στελέχους αγρίου τύπου. Συμπεραίνεται, ότι η κυτταρική επιμήκυνση των στελεχών BW25113(*pprC*) και  $\Delta$ *pprC*(*pprC*), οφείλεται στα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PprC. Ενώ, ειδικότερα είναι πιθανό να οφείλεται στην ενεργότητα ΡΡΙΑσης της, αφού η παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης PprC<sub>C41A</sub> παρουσιάζει την ίδια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου.

Επίσης, στην Εικόνα Γ.1.15.B1 και στην Εικόνα Γ.1.15.B2 παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των ίδιων στελεχών κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI, αντίστοιχα. Αντίθετα με την ομαδική κίνηση, η κυτταρική μορφολογία όταν υπερεκφράζεται το γονίδιο *pprC* όσο και το μεταλλαγμένο *pprC<sub>C41A</sub>* κατά την κολυμβητική κίνηση δε διαφοροποιείται, αφού τα κύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία με τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου.

#### Γ.1.4 Λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών από τις πεπτιδύλ-προλύλ ισομεράσες

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 (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 τα μέλη διαφορετικών οικογενειών δεν σχετίζονται δομικά και δεν εντοπίζεται ομολογία στην ακολουθία τους (Fanghänel and Fischer, 2004).

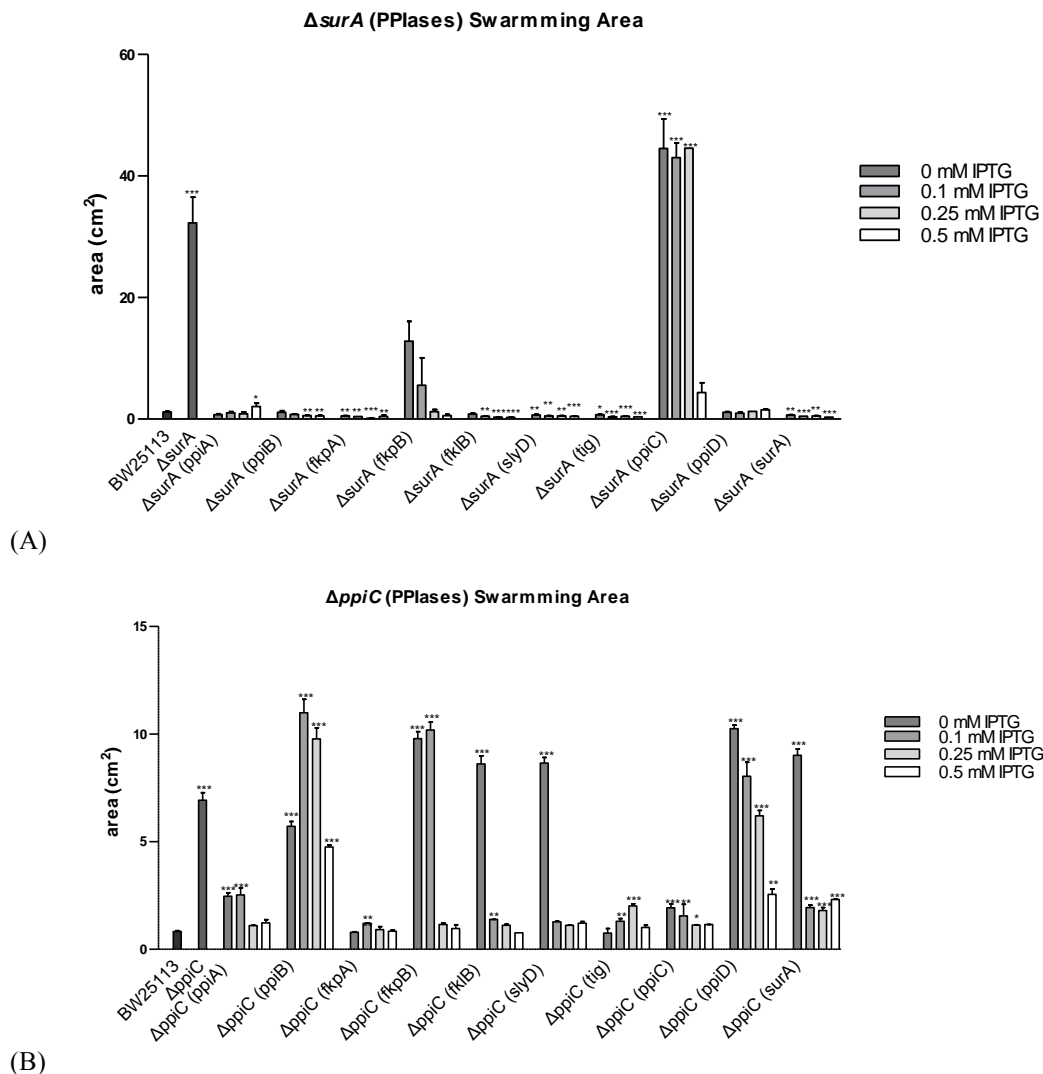
Εξαιτίας του ότι οι ΡΡΙΑσες αποτελούνται από τρεις οικογένειες πρωτεϊνών με συγκλίνουσα εξέλιξη, παρουσιάζει ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η λειτουργία κάθε παρβουλίνης ξεχωριστά, υποκαθίσταται από πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν και στις τρεις οικογένειες των ΡΡΙΑσών, αξιοποιώντας τους φαινοτύπους της ομαδικής κίνησης, της κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta$ *surA*,  $\Delta$ *pprD* και  $\Delta$ *pprC*.

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 (*pprA*, *pprB*, *fkpA*, *fkpB*, *fkIB*, *slyD*, *tig*, *pprC*, *pprD* και *surA*). Όλα τα pCA24N πλασμίδια με διάφορα κλωνοποιημένα γονίδια ελήφθησαν από τη βιβλιοθήκη ASKA του NARA Institute (Kitagawa et al., 2005).

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *pprA*-pCA24N, *pprB*-pCA24N, *fkpA*-pCA24N, *fkIB*-pCA24N, *fkpB*-pCA24N, *slyD*-pCA24N, *tig*-pCA24N, *pprC*-pCA24N, *pprD*-pCA24N και *surA*-pCA24N εισήχθησαν ανεξάρτητα σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη των παρβουλινών  $\Delta$ *surA*,  $\Delta$ *pprD* και  $\Delta$ *pprC*. Τα στελέχη που προέκυψαν εξετάστηκαν ως προς τη δυνατότητα επαναφοράς του φαινοτύπου αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου.

## Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των στελεχών που προέκυψαν, παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0,5 mM) και η κινητικότητα του βακτηριακού πληθυσμού *swarming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.1.16.).



**Εικόνα Γ.1.16.** Η λειτουργική υποκατάσταση των πρωτεϊνών SurA και PpiC από τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Διακρίνεται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών: (A) BW25113, *ΔsurA* καθώς και των *ΔsurA*(*ppiA*), *ΔsurA*(*ppiB*), *ΔsurA*(*fkpA*), *ΔsurA*(*fkpB*), *ΔsurA*(*fliB*), *ΔsurA*(*slyD*), *ΔsurA*(*tig*), *ΔsurA*(*ppiC*), *ΔsurA*(*ppiD*) και *ΔsurA*(*surA*), (B) BW25113, *ΔppiC* καθώς και των *ΔppiC*(*ppiA*), *ΔppiC*(*ppiB*), *ΔppiC*(*fkpA*), *ΔppiC*(*fkpB*), *ΔppiC*(*fliB*), *ΔppiC*(*slyD*), *ΔppiC*(*tig*), *ΔppiC*(*ppiC*), *ΔppiC*(*ppiD*) και *ΔppiC*(*surA*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0,05).

Από την Εικόνα Γ.1.16.A διαπιστώνεται ότι η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔsurA* επανέρχεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών όπως και από τα μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών. Ακόμα, από την οικογένεια των FKBP's ένα μέλος, η FkpB, υποκαθιστά λειτουργικά την SurA για όλες τις συγκεντρώσεις IPTG ενώ η FklB μόνο χωρίς IPTG επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου αφού πιθανώς τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφής αυτού του γονιδίου (*fklB*) είναι επαρκή ώστε να επαναφέρουν το φαινότυπο αγρίου τύπου. Η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων προκαλεί μείωση της ομαδικής κίνησης σε επίπεδα χαμηλότερα του στελέχους αγρίου τύπου άρα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι επαναφέρουν το φαινότυπο αφού μειώνουν αποτελεσματικά την αυξημένη ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔsurA*. Έτσι, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η φυσιολογική λειτουργία της SurA πρωτεΐνης, κατά την ομαδική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλες τις ΡΡΙάσες.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα Γ.1.16.B η ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔppiC*, μειώνεται στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου μετά από την έκφραση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ΡΡΙάσες της οικογένειας των FKBP's όπως και του γονιδίου *ppiA*. Ενώ, η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων στο στέλεχος *ΔppiC* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου. Άρα, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpiC, κατά την ομαδική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλα τα μέλη της οικογένειας των FKBP's και από την κυκλοφιλίνη PpiA.

Τέλος, δε διερευνήθηκε η λειτουργική υποκατάσταση της παρβουλίνης PpiD για την ομαδική κίνηση, αφού το στέλεχος *ΔppiD* σε αυτήν τη συνθήκη εμφανίζει τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος αγρίου τύπου.

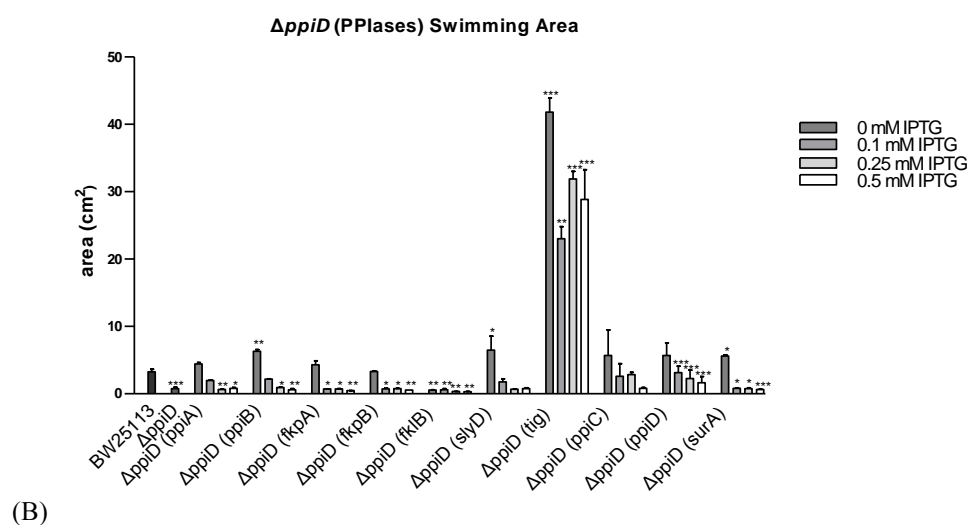
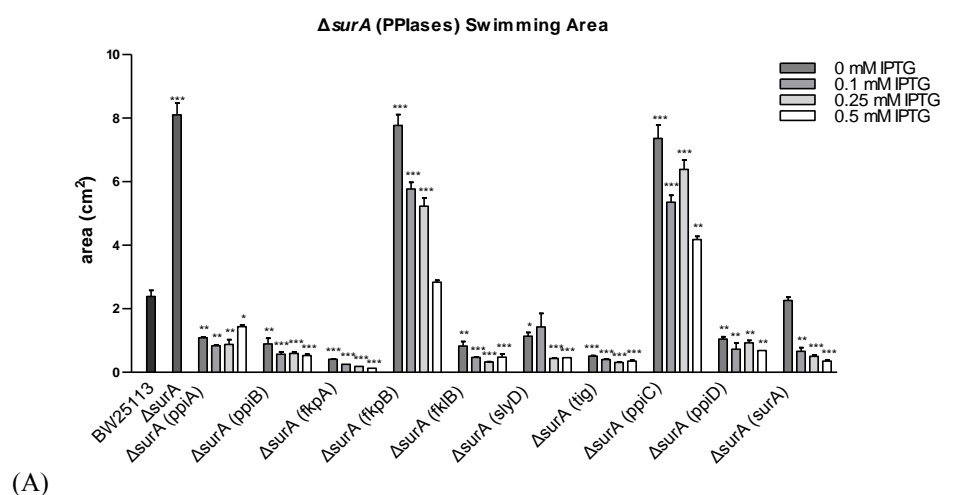
Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Γ.1.1 όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση με (+) και η μη λειτουργική υποκατάσταση με (-) των παρβουλινών SurA και PpiC από τις ΡΡΙάσες, κατά την ομαδική κίνηση.

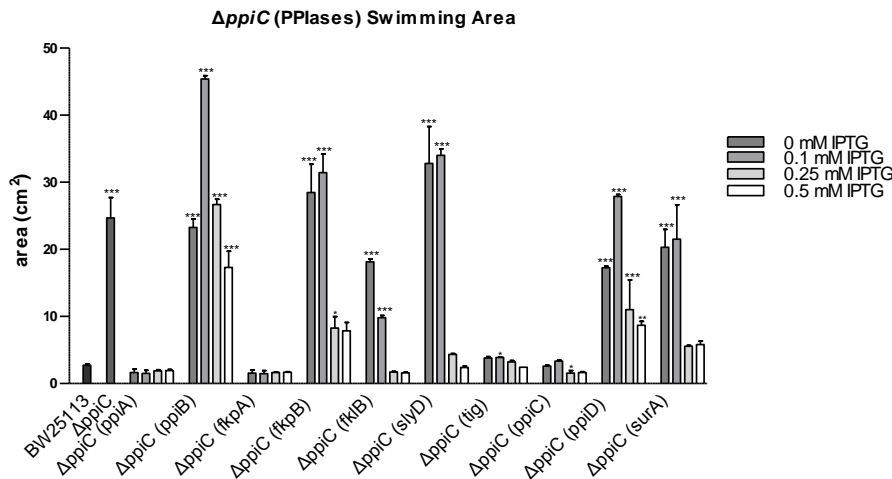
**Πίνακας Γ.1.1.** Η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών στην ικανότητα ομαδικής κίνησης από τις υπόλοιπες ΡΡΙάσες.

<u>Swarming</u>	<u>Cyps</u>		<u>FKBPs</u>					<u>Pars</u>		
	ppiA	ppiB	fkpA	fkpB	fklB	slyD	tig	ppiC	ppiD	surA
<i>ΔsurA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ΔppiC</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

## Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών που προέκυψαν, παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM) και η κινητικότητα του βακτηριακού πληθυσμού *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.1.17.).





(Γ)

**Εικόνα Γ.1.17.** Η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών από τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών, υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης. Διακρίνεται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών: (Α) BW25113, *ΔsurA* καθώς και των *ΔsurA(rriA)*, *ΔsurA(rriB)*, *ΔsurA(fkrA)*, *ΔsurA(fkrB)*, *ΔsurA(fklB)*, *ΔsurA(slyD)*, *ΔsurA(tig)*, *ΔsurA(rriC)*, *ΔsurA(rriD)* και *ΔsurA(surA)*, (Β) BW25113, *ΔrriD* καθώς και των *ΔrriD(rriA)*, *ΔrriD(rriB)*, *ΔrriD(fkrA)*, *ΔrriD(fkrB)*, *ΔrriD(fklB)*, *ΔrriD(slyD)*, *ΔrriD(tig)*, *ΔrriD(rriC)*, *ΔrriD(rriD)* και *ΔrriD(surA)*, (Γ) BW25113, *ΔrriC* καθώς και των *ΔrriC(rriA)*, *ΔrriC(rriB)*, *ΔrriC(fkrA)*, *ΔrriC(fkrB)*, *ΔrriC(fklB)*, *ΔrriC(slyD)*, *ΔrriC(tig)*, *ΔrriC(rriC)*, *ΔrriC(rriD)* και *ΔrriC(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0.05).

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα Γ.1.17.Α, η ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔsurA* μειώνεται στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου μετά από την έκφραση των γονιδίων *fkrB* και *slyD*. Η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων προκαλεί μείωση της κολυμβητικής κίνησης σε επίπεδα χαμηλότερα του στελέχους αγρίου τύπου άρα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι επαναφέρουν το φαινότυπο αφού μειώνουν αποτελεσματικά την αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔsurA*. Επομένως, η φυσιολογική λειτουργία της SurA πρωτεΐνης, κατά την κολυμβητική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλες τις ΡΡΙΑσες εκτός από την παρβουλίνη RriC.

Τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.17.Β έδειξαν ότι η φυσιολογική λειτουργία της RriD πρωτεΐνης υποκαταστάθηκε αποτελεσματικά από όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών, με μοναδικές εξαιρέσεις την πρωτεΐνη TF (*tig*) και την *FklB*. Επίσης, η *FkrA*, η *FkrB* αλλά και η *RriD*, μόνο χωρίς IPTG επαναφέρουν το φαινότυπο αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔrriD*, αφού πιθανώς τα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων είναι επαρκή ώστε να επαναφέρουν το φαινότυπο αγρίου τύπου. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης RriD, κατά την κολυμβητική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από τις RriA, RriB, FkrA, FkrB, SlyD, RriC και η SurA.

Ακόμα, από την Εικόνα Γ.1.17.Γ συνάγεται το συμπέρασμα ότι η φυσιολογική λειτουργία της παρβουλίνης RriC για την κολυμβητική κίνηση υποκαταστάθηκε αποτελεσματικά από όλα τα μέλη της

οικογένειας των FKBP πρωτεϊνών. Ακόμα, επαναφορά του φαινότυπου του στελέχους αγρίου τύπου στο στέλεχος  $\Delta rriC$  προκαλούν η PpiA και η SurA. Η έκφραση του γονιδίου  $rriC$  στο στέλεχος  $\Delta rriC(rriC)$  επαναφέρει το φαινότυπο στα φυσιολογικά επίπεδα. Συμπερασματικά, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpiC, κατά την κολυμβητική κίνηση, υποκαθίσταται από όλες τις PPIάσες εκτός από τις PpiB και PpiD.

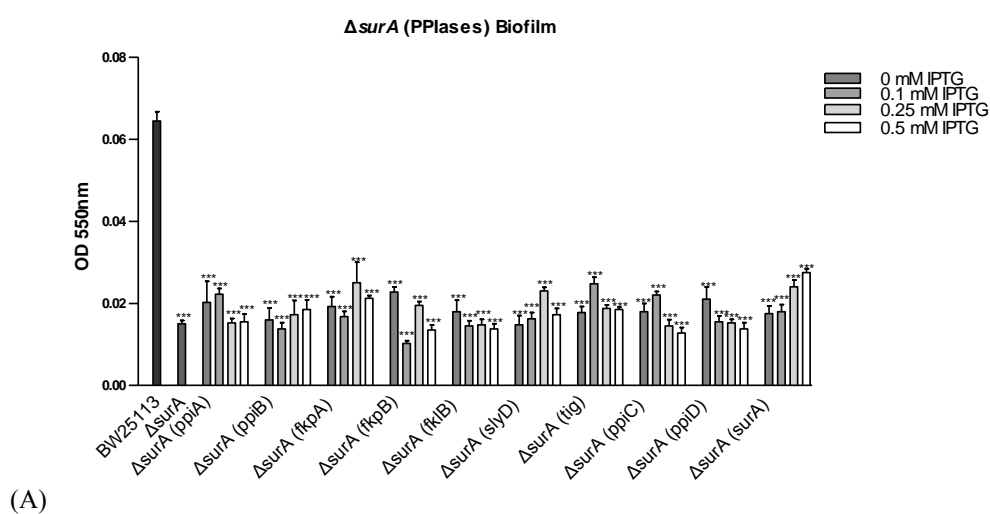
Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Γ.1.2. όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση με (+) και η μη λειτουργική υποκατάσταση με (-) των παρβουλινών από τις PPIάσες, κατά τη κολυμβητική κίνηση.

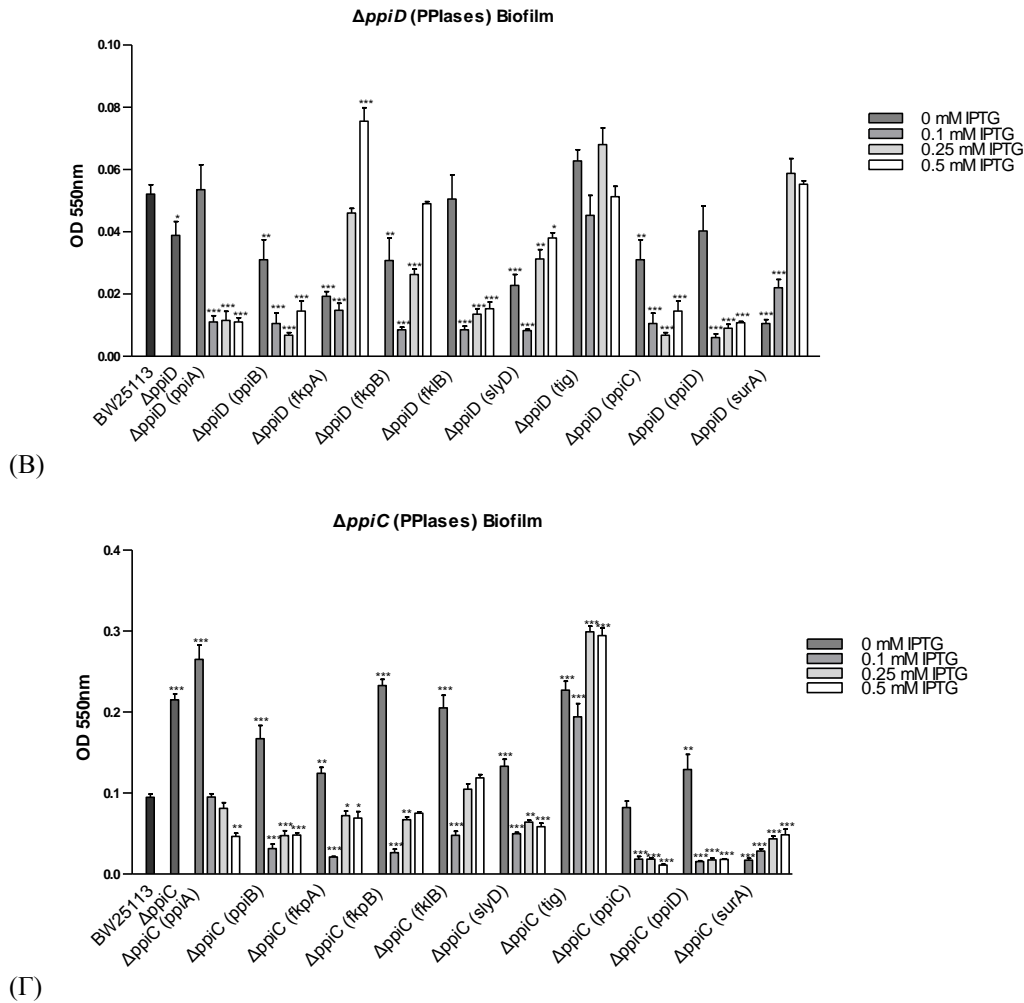
**Πίνακας Γ.1.2.** Η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών στην ικανότητα κολυμβητικής κίνησης από τις υπόλοιπες PPIάσες.

<u>Swimming</u>	Cyps		FKBPs					Pars		
	rriA	rriB	fkpA	fkpB	fkfB	slyD	tig	rriC	rriD	surA
$\Delta surA$	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
$\Delta rriD$	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
$\Delta rriC$	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών που προέκυψαν, παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστευρενίου (96-well plates) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Στη συνέχεια, η ικανότητα τους συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.1.18.).





**Εικόνα Γ.1.18.** Η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών από τα μέλη της υπερικογένειας των ΡΡΙΑσών υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Διακρίνεται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών: (Α) BW25113, *ΔsurA* καθώς και των *ΔsurA(rriA)*, *ΔsurA(rriB)*, *ΔsurA(fkpA)*, *ΔsurA(fkpB)*, *ΔsurA(fklB)*, *ΔsurA(slyD)*, *ΔsurA(tig)*, *ΔsurA(rriC)*, *ΔsurA(rriD)* και *ΔsurA(surA)*, (Β) BW25113, *ΔrriD* καθώς και των *ΔrriD(rriA)*, *ΔrriD(rriB)*, *ΔrriD(fkpA)*, *ΔrriD(fkpB)*, *ΔrriD(fklB)*, *ΔrriD(slyD)*, *ΔrriD(tig)*, *ΔrriD(rriC)*, *ΔrriD(rriD)* και *ΔrriD(surA)*, (Γ) BW25113, *ΔrriC* καθώς και των *ΔrriC(rriA)*, *ΔrriC(rriB)*, *ΔrriC(fkpA)*, *ΔrriC(fkpB)*, *ΔrriC(fklB)*, *ΔrriC(slyD)*, *ΔrriC(tig)*, *ΔrriC(rriC)*, *ΔrriC(rriD)* και *ΔrriC(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τεσσάρων 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.18.Α διαπιστώνεται ότι καμία από τις πεπτιδύλ-προλύλ ισομεράσες δεν υποκαθιστούν τη φυσιολογική ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου για το στέλεχος *ΔsurA*, αφού σε καμία περίπτωση δεν επαναφέρεται ο φαινότυπος του στελέχους αγρίου τύπου.

Ακόμα, από την Εικόνα Γ.1.18.Β συμπεραίνεται ότι τη φυσιολογική ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου για την παρβουλίνη *RriD* την υποκαθιστούν τέσσερα μέλη της οικογένειας των FKBP, η *FkpA*, η *FkpB*, η *FklB* και η *TF(tig)*. Ενώ από την οικογένεια των παρβουλινών μόνο ένα μέλος παρουσιάζει λειτουργική υποκατάσταση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, η *SurA*, αφού



επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα χαμηλά επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *ppiA*, *fkIB* και *ppiD* στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiD*, είναι ικανά να επαναφέρουν το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου χωρίς προσθήκη IPTG. Επομένως, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpiD, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από την κυκλοφιλίνη PpiA, τις FkpA, FkpB, FklB και TF(tig), μέλη της οικογένειας των FKBP, και την παρβουλίνη SurA.

Τέλος, από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.1.18.Γ συμπεραίνεται ότι τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpiC για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου την υποκαθιστούν δύο μέλη της οικογένειας των FKBP, η FkpB και η FklB, όπως και ένα μέλος από την οικογένεια των κυκλοφιλινών, η PpiA. Η PpiC επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiC*. Η FkpA παρουσιάζει αποτελεσματική τάση για μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου και επαναφοράς του φαινότυπου του στελέχους αγρίου τύπου. Ενώ, η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiC* προκαλεί μείωση της αυξημένης του ικανότητας για σχηματισμό βιοϋμενίου σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά του στελέχους αγρίου τύπου. Οπότε, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpiC, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλες τις PPIάσες εκτός από την TF(tig).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Γ.1.3. όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση με (+) και η μη λειτουργική υποκατάσταση με (-) των παρβουλινών από τις PPIάσες, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου.

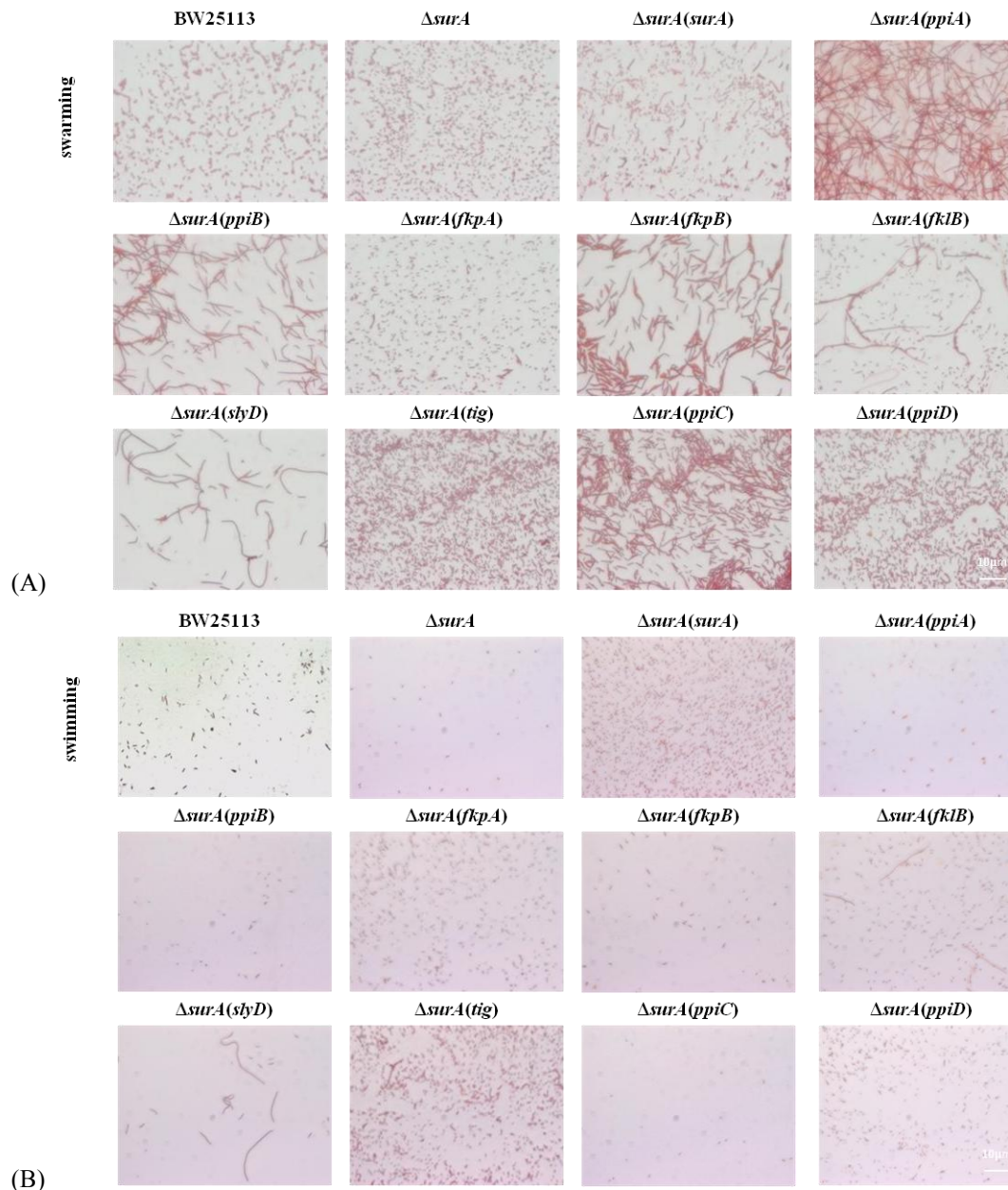
**Πίνακας Γ.1.3.** Η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών στο σχηματισμό βιοϋμενίου από τις υπόλοιπες PPIάσες.

<b>Biofilm</b>	<b>Cyps</b>		<b>FKBPs</b>					<b>Pars</b>		
	<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>
$\Delta$ <i>surA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta$ <i>ppiD</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
$\Delta$ <i>ppiC</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

### Γ.1.5 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών $\Delta$ *surA*(PPIases), $\Delta$ *ppiC*(PPIases) $\Delta$ *ppiD*(PPIases) κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση

Στη συνέχεια διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των διάφορων PPIασών στα μεταλλαγμένα στελέχη των παρβουλινών επηρεάζει τη κυτταρική μορφολογία κατά την ομαδική κίνηση. Εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta$ *surA* καθώς και των  $\Delta$ *surA*(*ppiA*),  $\Delta$ *surA*(*ppiB*),  $\Delta$ *surA*(*fkpA*),  $\Delta$ *surA*(*fkpB*),  $\Delta$ *surA*(*fklB*),  $\Delta$ *surA*(*slyD*),  $\Delta$ *surA*(*tig*),  $\Delta$ *surA*(*ppiC*),  $\Delta$ *surA*(*ppiD*) και  $\Delta$ *surA*(*surA*). Τα παραπάνω στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν (2  $\mu$ l) στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επώαστηκαν επί διάστημα 20 h στους 30 °C. 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 πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

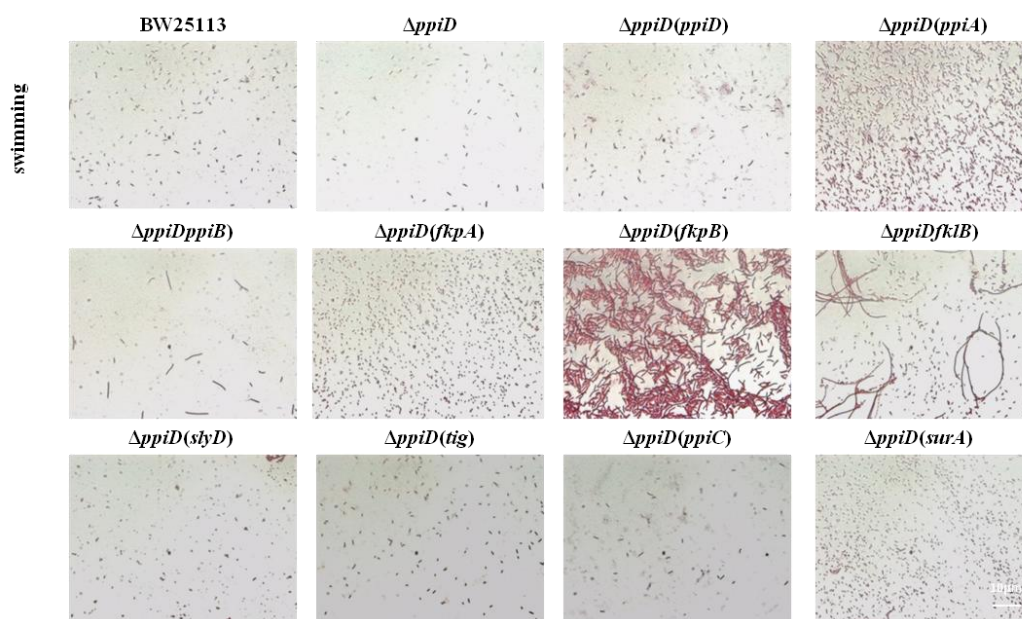


**Εικόνα Γ.1.19.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta surA$  καθώς και των  $\Delta surA(ppiA)$ ,  $\Delta surA(ppiB)$ ,  $\Delta surA(fkpA)$ ,  $\Delta surA(fkpB)$ ,  $\Delta surA(fklB)$ ,  $\Delta surA(slyD)$ ,  $\Delta surA(tig)$ ,  $\Delta surA(ppiC)$ ,  $\Delta surA(ppiD)$  και  $\Delta surA(surA)$ , κατά την ομαδική κίνηση (A) και την κολυμβητική κίνηση (B) με χρώση Gram έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Από την Εικόνα Γ.1.19.A, παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των PpiA, PpiB, FkpB, FklB, SlyD και PpiC, στο στέλεχος  $\Delta surA$  προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και οδηγεί στο σχηματισμό

επιμηκυσμένων κυττάρων, κατά την ομαδική κίνηση. Αντίστοιχα, κατά την κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.1.19.Β), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των FklB και SlyD στο στέλεχος *ΔsurA* οδηγεί στο σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων.

Επίσης, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔppiD* καθώς και των *ΔppiD(ppiA)*, *ΔppiD(ppiB)*, *ΔppiD(fkpA)*, *ΔppiD(fkpB)*, *ΔppiD(fklB)*, *ΔppiD(slyD)*, *ΔppiD(tig)*, *ΔppiD(ppiC)*, *ΔppiD(ppiD)* και *ΔppiD(surA)*. Τα κύτταρα ελήφθησαν όπως περιγράφηκε παραπάνω από την αναπτυσσόμενη αποικία τρυβλίων *swimming*. Η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

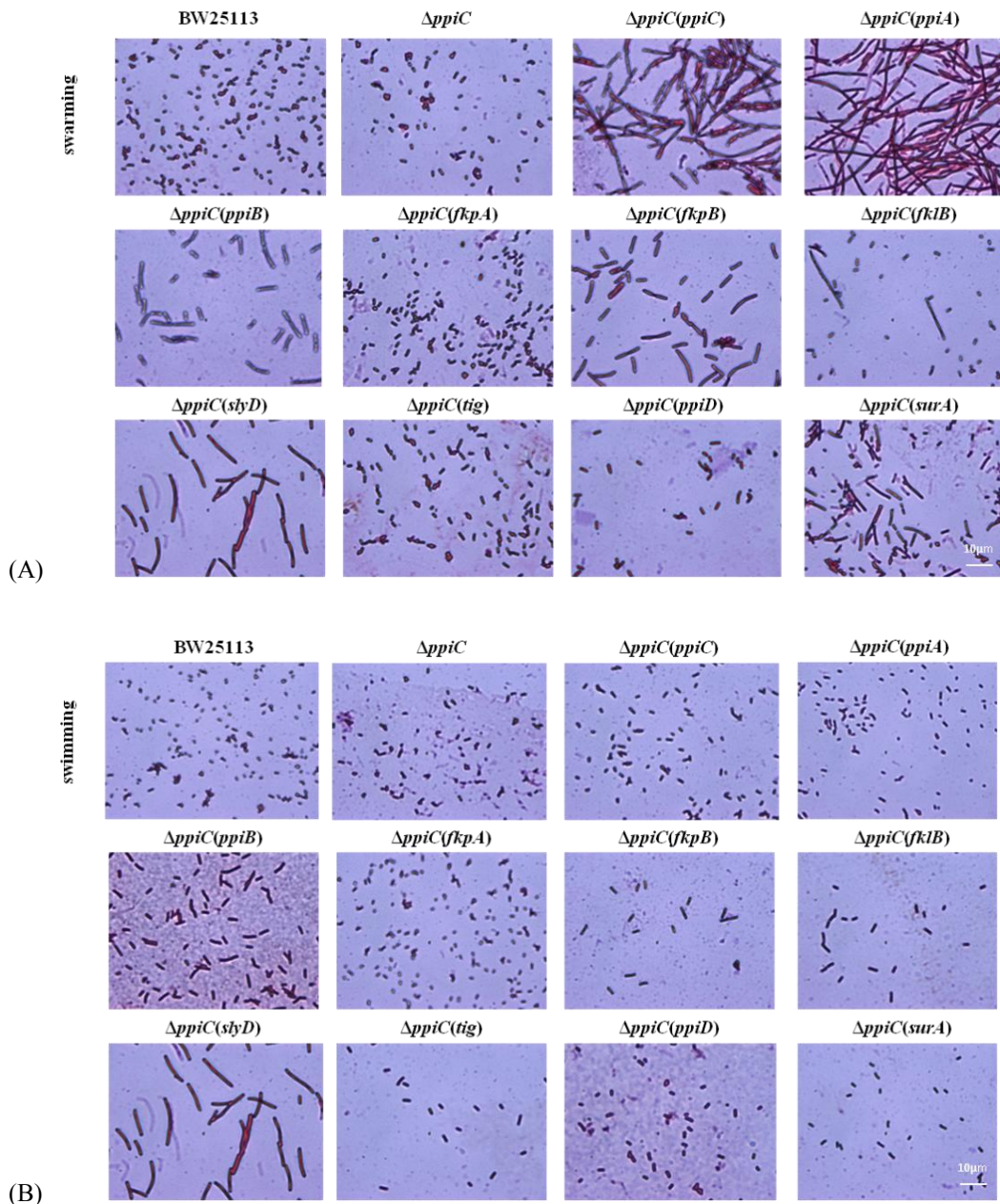


**Εικόνα Γ.1.20.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔppiD* καθώς και των *ΔppiD(ppiA)*, *ΔppiD(ppiB)*, *ΔppiD(fkpA)*, *ΔppiD(fkpB)*, *ΔppiD(fklB)*, *ΔppiD(slyD)*, *ΔppiD(tig)*, *ΔppiD(ppiC)*, *ΔppiD(ppiD)* και *ΔppiD(surA)* κατά την και την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Κατά την κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.1.20), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των PpiB, FkpB και FklB στο στέλεχος *ΔppiD* προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και οδηγεί στο σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων.

Τέλος, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔppiC* καθώς και των *ΔppiC(ppiA)*, *ΔppiC(ppiB)*, *ΔppiC(fkpA)*, *ΔppiC(fkpB)*, *ΔppiC(fklB)*, *ΔppiC(slyD)*, *ΔppiC(tig)*, *ΔppiC(ppiC)*, *ΔppiC(ppiD)* και *ΔppiC(surA)*. Τα κύτταρα ελήφθησαν όπως περιγράφηκε παραπάνω από την αναπτυσσόμενη αποικία τρυβλίων *swarming* και *swimming*. Η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.





**Εικόνα Γ.1.21.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta ppiC$  καθώς και των  $\Delta ppiC(ppiA)$ ,  $\Delta ppiC(ppiB)$ ,  $\Delta ppiC(fkpA)$ ,  $\Delta ppiC(fkpB)$ ,  $\Delta ppiC(fklB)$ ,  $\Delta ppiC(slyD)$ ,  $\Delta ppiC(tig)$ ,  $\Delta ppiC(ppiC)$ ,  $\Delta ppiC(ppiD)$  και  $\Delta ppiC(surA)$ , κατά την ομαδική κίνηση (A) και την κολυμβητική κίνηση (B) με χρώση Gram έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Από την Εικόνα Γ.1.21.A, παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των PpiC, PpiA, PpiB, SlyD και FkpB στο στέλεχος  $\Delta ppiC$  προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και οδηγεί στο σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων, κατά την ομαδική κίνηση.

Ενώ, κατά την κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.1.21.B), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των PpiB, FkpB και FklB στο στέλεχος  $\Delta ppiC$  οδηγεί σε μέτρια αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η υπερέκφραση της SlyD στο στέλεχος  $\Delta ppiC$  προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων.

Συνολικά συμπεραίνεται ότι η υπερέκφραση των PpiC, PpiA, PpiB, SlyD και FkpB τόσο στο *ΔsurA* στέλεχος όσο και στο *ΔppiC* στέλεχος προκαλεί αλλαγή στη κυτταρική μορφολογία των κυττάρων κατά την ομαδική κίνηση ενώ η FklB προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα μόνο όταν υπερεκφράζεται στο *ΔsurA* στέλεχος υποδηλώνοντας ότι για την παρατηρούμενη μορφολογία δεν ευθύνεται μόνο η υπερέκφραση κάποιων συγκεκριμένων PPIασών αλλά και η έλλειψη της αντίστοιχης παρβουλίνης. Επίσης φαίνεται ότι μεγάλη σημασία έχουν και οι συνθήκες ανάπτυξης αφού κατά την κολυμβητική κίνηση τα αποτελέσματα διαφέρουν. Κατά την κολυμβητική κίνηση η υπερέκφραση της FklB προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη των παρβουλινών, η υπερέκφραση της SlyD προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα μόνο στα στελέχη *ΔsurA* και *ΔppiC*, ενώ η υπερέκφραση των PpiB και FkpB προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα μόνο στα στελέχη *ΔppiC* και *ΔppiD*.

## Γ.1.6 Μελέτη των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της παρβουλίνης SurA

### Γ.1.6.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την SurA

Τα διάφορα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών 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. Μέσα από την εύρεση αλληλεπιδράσεων των παρβουλινών με τις πρωτεΐνες στόχους θα κατανοηθεί καλύτερα η λειτουργία τους.

Αρχικά αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων IntAct πρωτεΐνες του *E.coli*, οι οποίες πιθανά αλληλεπιδρούν με την SurA (Arifuzzaman et al., 2006). Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου SurA<sub>His</sub> (His-6 επίτοπο) στο *E.coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλεγμάτων της SurA<sub>His</sub> με αυτές, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Στη συνέχεια, τα συμπλέγματα αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, και απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες συνεκκλούνται από τη στήλη Ni-NTA αγαρόζης, ταυτόχρονα με την SurA<sub>His</sub>. Τέλος, προσδιορίστηκε μερικώς η αλληλουχία των αμινοξέων τους (Arifuzzaman et al., 2006). Η επιλογή των πρωτεϊνών στόχων βασίστηκε και στην ύπαρξη προλινών που διατηρούν την *cis* μορφή τους στη κρυσταλλική δομή τους. Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη προλινών που διατηρούν την *cis* διαμόρφωση σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες υποδεικνύει την πιθανή ρύθμιση της λειτουργίας του ενζύμου μέσω *cis/trans* ισομερισμού (Schmidpeter et al., 2015, Schmid 1993), έτσι ώστε η απαίτηση μιας PPIάσης μπορεί να είναι αναγκαία. Οι πρωτεΐνες οι οποίες επιλέχθηκαν θα αναφέρονται ως πρωτεΐνες στόχοι (Πίνακας Γ.1.4.).

**Πίνακας Γ.1.4.** Πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της παρβουλίνης SurA (M.B. 47.9kD).

Πρωτεΐνες στόχοι της SurA	Όνομα Πρωτεΐνης	M.B.	Cis προλίνες
<b>DldH</b> (b0116/JW0112)	αφυδρογονάση της λιποαμίδης	50.68kD	P138
<b>FtsH</b> (b3178/JW3145)	ATP – εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου	75.2kD	P254
<b>DnaK</b> (b0014/JW0013)	συνοδός πρωτεΐνη Hsp70	69.1kD	P419, P143, P370

### Γ.1.6.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της SurA με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους

Μελετήθηκαν, τρεις πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανόν αλληλεπιδρά η SurA: η αφυδρογονάση της λιποαμίδης (DldH), η ATP – εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου (FtsH) και η συνοδός πρωτεΐνη Hsp70 (DnaK). Πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της SurA με τις τρεις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1. Η SurA φέρει τον His-επιτόπιο (His-6) στο αμινοτελικό άκρο της ενώ οι τρεις πιθανές αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες φέρουν το S επιτόπιο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (ως τρία διαφορετικά πολυπεπτίδια). Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν με χρωματογραφία νικελίου (*Ni-resin* χρωματογραφία συγγενείας), χρωματογραφία συγγένειας δηλαδή για τον HIS επίτοπο. Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε σε κύτταρα *E.coli BL21 DE3*.

Με αυτήν τη μέθοδο όπου γίνεται εντοπισμός των σταθερών συμπλόκων πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, δεν ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της SurA με καμία από τις τρεις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Η αδυναμία εντοπισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ της SurA και των πιθανών πρωτεϊνών στόχων πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη παροδικών αλληλεπιδράσεων της SurA με αυτές τις πρωτεΐνες στόχους (*transient interaction*), αφού η SurA έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά παροδικά με πρωτεΐνες στόχους της όπως η αλληλεπίδρασή της με την YaeT (Vuong et al., 2008) ή στην προτίμηση της SurA για πλήρως ή μερικώς μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στόχους.

## Γ.1.7 Μελέτη των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της παρβουλίνης PpiD

### Γ.1.7.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την PpiD

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η εύρεση αλληλεπιδράσεων της παρβουλίνης PpiD με πιθανές πρωτεΐνες στόχους θα βοηθήσει στη κατανόηση της λειτουργία της. Για αυτό το σκοπό αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων IntAct πρωτεΐνες του *E.coli*, οι οποίες πιθανά αλληλεπιδρούν με την PpiD (Arifuzzaman et al., 2006). Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν έπειτα από τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω και η επιλογή των πρωτεϊνών στόχων πραγματοποιήθηκε με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι πρωτεΐνες οι οποίες επιλέχθηκαν θα αναφέρονται ως πρωτεΐνες στόχοι (Πίνακας Γ.1.5.).

**Πίνακας Γ.1.5.** Πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της παρβουλίνης PpiD (M.B. 68,14kD).

Πρωτεΐνες στόχοι της PpiD	Όνομα Πρωτεΐνης	M.B.	Cis προλίνες
<b>Odo2</b> (b0727/JW0716)	dihydrolipoyltranssuccinase	44.01kD	P340
<b>G6pD</b> (b1852/JW1841)	1-αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης	56.28kD	P172
<b>GlpD</b> (b3426/JW3389)	αερόβια αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκερόλης	56.75 kD	P378
<b>Ydjj</b> (b1774/JW1763)	προβλεπόμενη, Zn-εξαρτώμενη και NAD(P) δεσμευόμενη οξυδοορεδοκτάση	40.43kD	P120

### Γ.1.7.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PpiD με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους

Μελετήθηκαν τέσσερις πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανόν αλληλεπιδρά η PpiD: η dihydrolipoyltranssuccinase (Odo2), η 1-αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6pD), η αερόβια αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκερόλης (GlpD) και η Zn-εξαρτώμενη και NAD(P) δεσμευόμενη οξυδορεδοκτάση (YdjJ).

Πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της PpiD με τις τέσσερις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1. Η PpiD φέρει τον His-επιτόπιο (His-6) στο αμινοτελικό άκρο της ενώ οι τέσσερις πιθανές πρωτεΐνες στόχοι φέρουν το S επιτόπιο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (ως τέσσερα διαφορετικά πολυπεπτίδια). Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν με χρωματογραφία νικελίου, χρωματογραφία συγγένειας δηλαδή για τον HIS επίτοπο. Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε σε κύτταρα *E.coli BL21 DE3*.

Με αυτήν τη μέθοδο όπου γίνεται εντοπισμός των σταθερών συμπλόκων πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, δεν ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της PpiD με καμία από τις τέσσερις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Όπως και στην περίπτωση της SurA, η αδυναμία εντοπισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ της PpiD και των πιθανών πρωτεϊνών στόχων πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη παροδικών αλληλεπιδράσεων της PpiD με αυτές τις πρωτεΐνες στόχους (*transient interaction*), αφού η PpiD έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά παροδικά με πρωτεΐνες στόχους της όπως η αλληλεπίδρασή της με την SecY (Sachelarü et al., 2014) ή στην προτίμηση της PpiD για πλήρως ή μερικώς μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στόχους.

### Γ.1.8 Μελέτη των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της παρβουλίνης PpiC

#### Γ.1.8.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την PpiC

Για να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο η παρουσία ή η απουσία της της παρβουλίνης PpiC μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης όπως και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στο *E.coli*, θεωρήθηκε ότι οι αλλαγές αυτές είναι πιθανό να επιτυγχάνονται μέσω των αλληλεπιδράσεων της PpiC με πρωτεΐνες στόχους, όπως και μέσω της μετά-μεταφραστικής ρύθμισης των λειτουργιών ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών από την PpiC.

Στη βάση δεδομένων IntAct αναζητήθηκαν πρωτεΐνες του *E.coli*, οι οποίες πιθανά αλληλεπιδρούν με την PpiC (Arifuzzaman et al., 2006). Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν έπειτα από τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω και η επιλογή των πρωτεϊνών στόχων πραγματοποιήθηκε με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι πρωτεΐνες οι οποίες επιλέχθηκαν θα αναφέρονται ως πρωτεΐνες στόχοι (Πίνακας Γ.1.6.).

**Πίνακας Γ.1.6.** Πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της παρβουλίνης PpiC (M.B.:10.7kD).

– : εντοπίζονται *cis* προλίνες στις κρυσταλλογραφικές δομές ομόλογων πρωτεϊνών του *E.coli*

Πρωτεΐνες στόχοι της PpiC	Όνομα Πρωτεΐνης	M.B.	Cis προλίνες
AccD(b2316/JW2313)	καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA	44.01kD	P204
Yehx(b2129/JW2117)	ATP – δεσμευόμενη υπομονάδα μεταφορέα , ABC υπεροικογένειας	34.88kD	P237
MukB(b0924/JW0907)	ATPάση DNA– δεσμευόμενη υπομονάδα	170.102kD	-
L11(b3983/JW3946)	50S ριβοσωμική πρωτεΐνη L11	14.87 kD	P21,P22
L7/L12(b3986/JW3949)	50S ριβοσωμική πρωτεΐνη L7/L12	12.29kD	-

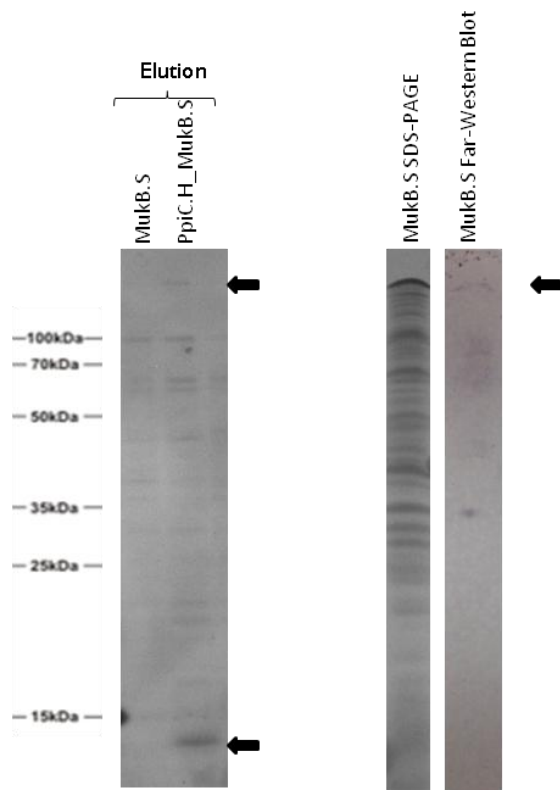
### Γ.1.8.2 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PpiC με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους

Μελετήθηκαν τρεις πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανόν αλληλεπιδρά η PpiC: η καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (AccD), η ATP–δεσμευόμενη υπομονάδα μεταφορέα που ανήκει στην ABC υπεροικογένεια (Yehx) και η ATPάση DNA–δεσμευόμενη υπομονάδα, που σχετίζεται με τη χρωμοσωμική διαίρεση (MukB). Πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της PpiC με τις τρεις πιθανές αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1. Η PpiC φέρει τον His-επιτόπιο (His-6) στο αμινοτελικό άκρο της ενώ οι τρεις πιθανές αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες φέρουν το S επιτόπιο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (ως τρία διαφορετικά πολυπεπίδια). Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν με χρωματογραφία νικελίου, χρωματογραφία συγγένειας δηλαδή για τον HIS επίτοπο. Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε σε κύτταρα *E.coli BL21 DE3*.

Με αυτήν τη μέθοδο όπου γίνεται εντοπισμός των σταθερών συμπλόκων πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, μετά από ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλυσης σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (Εικόνα Γ.1.22), ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της PpiC με την MukB. Επιβεβαιώθηκε, ότι το S επιτόπιο της MukB δε δεσμεύεται από τα Ni-NTA σφαιρίδια της αγαρόζης. Τέλος, η αλληλεπίδραση της PpiC με την MukB επιβεβαιώθηκε με overlay αποτύπωση κατά Western (Far-Western Blot). Το αποτύπωμα κατά Far-Western είναι παρόμοιο με το αποτύπωμα κατά Western. Στην τεχνική Western, ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει το αντίστοιχο αντιγόνο σε μία μεμβράνη, ενώ στην ανάλυση κατά Far-Western, μια σημασμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον εντοπισμό μιας πρωτεΐνης στόχου επί της μεμβράνης. Το δείγμα (συνήθως ένα προϊόν λύσης) που περιέχει την άγνωστη πρωτεΐνη-στόχο διαχωρίζεται σε αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) ή μη αποδιατακτική και κατόπιν μεταφέρεται σε μία μεμβράνη. Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη φράσσεται και έπειτα ανιχνεύεται με τη γνωστή πρωτεΐνη που φέρει τη σήμανση. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται, ένα σύστημα ανίχνευσης, ανάλογα με τη σήμανση της γνωστής πρωτεΐνης. Εάν η σημασμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-στόχο τότε η δεύτερη εμφανίζεται στη μεμβράνη στη ζώνη που αντιστοιχεί. Έτσι, για να εντοπιστεί η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση, μετά τη μεταφορά της MukB<sub>Stag</sub> στη μεμβράνη έγινε χρήση αντισωμάτων, πρώτα χρησιμοποιήθηκε η PpiC<sub>His</sub> και έπειτα χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του His επιτοπίου της PpiC<sub>His</sub> (Εικόνα Γ.1.23.). Η αδυναμία εντοπισμού περισσότερων αλληλεπιδράσεων πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη παροδικών αλληλεπιδράσεων της PpiC με τις πιθανές πρωτεΐνες



στόχους (*transient interaction*) ή στην προτίμηση της PprC για πλήρως ή μερικώς μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στόχους.



**Εικόνα Γ.1.22.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της *EcpriC* με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *EcmukB*. Έκφραση των  $MukB_{Stag}$ ,  $PprC_{His}$ - $MukB_{Stag}$  σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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. Τέλος, φαίνεται η αποτύπωση κατά Far-Western με τη χρήση αντισωμάτων, πρώτα την  $PprC_{His}$  και έπειτα έναντι του His επιτοπίου μετά την Ni-NTA απομόνωση της  $PprC_{His}$ .

### Γ.1.9 Ο ρόλος της PprC στην κυτταρική διαίρεση στο *E.coli*

Όπως παρατηρήθηκε η υπερέκφραση του γονιδίου *pprC* δημιουργεί επιμηκυσμένα κύτταρα, τόσο όταν υπερεκφράζεται στο στέλεχος  $\Delta pprC$  όσο και όταν υπερεκφράζεται στο στέλεχος BW25113. Αντίθετα όταν υπερεκφράζεται το μεταλλαγμένο γονίδιο *pprC<sub>C41A</sub>* τα κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία, παρόμοια με την αντίστοιχη του στελέχους αγρίου τύπου. Από αυτές τις παρατηρήσεις συμπεραίνεται ότι η κυτταρική επιμήκυνση που παρατηρήθηκε οφείλεται στα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PprC και ειδικότερα είναι πιθανό να οφείλεται στην ενεργότητα PPIάσης της, αφού η παρουσία της πρωτεΐνης  $PprC_{C41A}$  παρουσιάζει την ίδια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η PprC πιθανώς ενεργοποιεί αναστολές της κυτταρικής διαίρεσης ή αδρανοποιεί προαγωγείς της κυτταρικής διαίρεσης ή ακόμα και ρυθμίζει τη λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση. Για αυτόν το σκοπό εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση στο βακτήριο *Escherichia coli* και από τις κρυσταλλικές δομές τους, εντοπίστηκαν ποιες από αυτές διαθέτουν *cis* προλίνες (Πίνακας

Γ.1.7.). Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη προλινών που διατηρούν την *cis* διαμόρφωση σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες υποδεικνύει την πιθανή ρύθμιση της λειτουργίας του ενζύμου μέσω *cis/trans* ισομερισμού (Schmidpeter et al., 2015, Schmid 1993), έτσι ώστε η απαίτηση μιας PPIάσης μπορεί να είναι αναγκαία.

**Πίνακας Γ.1.7.** Πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της παρβουλίνης PpiC που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση.

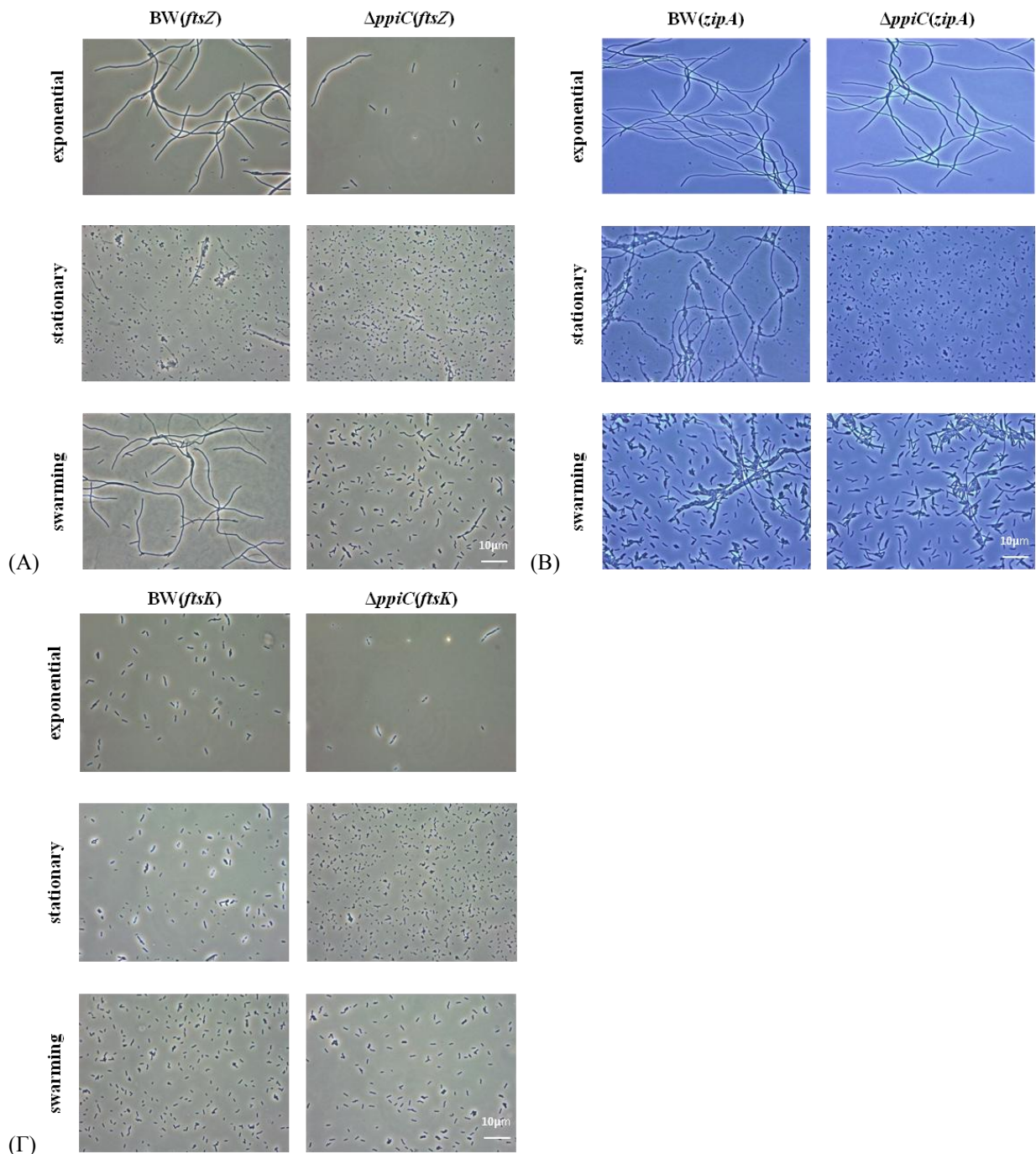
- : εντοπίζονται *cis* προλίνες στις κρυσταλλογραφικές δομές ομόλογων πρωτεϊνών του *E.coli*

\* : δεν εντοπίζονται *cis* προλίνες

Πρωτεΐνες Κυτταρικής Διαίρεσης	Όνομα Πρωτεΐνης	M.B.	Cis προλίνες
<b>SulA</b> (b0958/JW0941)	αναστολέας της κυτταρικής διαίρεσης	18.54 kD	-
<b>FtsZ</b> (b0095/JW0093)	GTP-δεσμευόμενη πρωτεΐνη κυτταρικής διαίρεσης	40.32kD	*
<b>ZipA</b> (b2412/JW2404)	σταθεροποιητής <i>ftsZ</i>	36.47kD	P67, P89
<b>FtsQ</b> (b0093/JW0091)	πρωτεΐνη που ανήκει στη συνδεσμολογία του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου υπεύθυνου για τη συναρμολόγηση του διαφραγματικού δακτυλίου	31.43kD	P116
<b>MinC</b> (b1176/JW1165)	πρωτεΐνη που προσδιορίζει τη θέση του διαφραγματικού δακτυλίου	24.77kD	-
<b>FtsK</b> (b0890/JW0873)	πρωτεΐνη του διαφράγματος που απαιτείται για το χρωμοσωμικό διαχωρισμό	146.64kD	P985, P1108, P524

#### Γ.1.9.1 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και *ΔppiC* όταν υπερεκφράζονται σε αυτά οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση

Διερευνήθηκε εάν η λειτουργία των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση ρυθμίζεται από την παρβουλίνη PpiC. Αρχικά, ελέγχθηκε εάν αλλάζει η κυτταρική μορφολογία όταν υπερεκφράζονται, στα στελέχη BW25113 και *ΔppiC*, απουσία και παρουσία δηλαδή της PpiC. Για αυτό το σκοπό, τα στελέχη BW25113 και *ΔppiC* μετασχηματίστηκαν με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης *ftsZ*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N, *zipA*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N, *minC*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N, *ftsK*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N, *sulA*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N και *ftsQ*<sub>His</sub>-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 και σε τριβλία *swarming*, σε θερμοκρασία 30 °C και η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών διεξήχθη κατά την εκθετική και τη στατική φάση ανάπτυξης, όπως και κατά την ομαδική κίνηση, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης. Όλα τα pCA24N-GFP πλασμίδια με διάφορα κλωνοποιημένα γονίδια ελήφθησαν από τη βιβλιοθήκη ASKA του NARA Institute (Kitagawa et al., 2005).



**Εικόνα Γ.1.23.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών (A) *BW25113(ftsZ)*,  $\Delta ppiC(ftsZ)$ , (B) *BW25113(zipA)*,  $\Delta ppiC(zipA)$ , (Γ) *BW25113(ftsK)*,  $\Delta ppiC(ftsK)$  κατά την εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης και κατά την ομαδική κίνηση, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης, σε συγκέντρωση 0,1 mM IPTG.

Η έναρξη της συναρμολόγησης του Z-δακτυλίου ελέγχεται αυστηρά από την πρωτεΐνη FtsZ, τόσο χρονικά όσο και χωρικά ώστε να αποτραπεί ανώμαλη διαφραγματοποίηση. Ο Z-δακτύλιος οργανώνεται από τα γραμμικά FtsZ-πρωτοϊνίδια που στο βακτήριο *Escherichia coli* είναι συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη του κυταροπλάσματος από τις πρωτεΐνες FtsA και ZipA. Από την κυτταρική μορφολογία του στελέχους *BW25113(ftsZ)* (Εικόνα Γ.1.23.A), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της FtsZ κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων λόγω

αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης. Ενώ, η λειτουργία της απαιτείται για την κυτταρική διαίρεση ωστόσο η αυξημένη έκφραση της FtsZ μπορεί να προκαλέσει επιμήκυνση των κυττάρων (Ward and Lutkenhaus, 1985). Αντίθετα, όταν εκφράζεται στο στέλεχος *ΔppiC*, παρατηρούνται λιγότερα επιμηκυσμένα κύτταρα. Το ίδιο παρατηρείται όταν τα κύτταρα των αντίστοιχων στελεχών παρατηρούνται κατά την ομαδική κίνηση, όπου τα κύτταρα του στελέχους *ΔppiC(ftsZ)* παρουσιάζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν, η PpiC υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης και σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της FtsZ και πιθανώς δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαίρεσης.

Από την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*zipA*) και *ΔppiC(zipA)* (Εικόνα Γ.1.23.B), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της ZipA κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, λόγω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης, προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων. Αν και η ήπια έκφραση της ZipA είναι γνωστό ότι δεν παρεμβαίνει στην κυτταρική διαίρεση (Hale et al., 1997), η υπερέκφραση προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα αναστέλλοντας τη διαίρεση (Cabré et al., 2013). Όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη στατική φάση ανάπτυξης παρατηρείται ότι τα κύτταρα του στελέχους *ΔppiC(zipA)* έχουν διαιρεθεί φυσιολογικά, ενώ τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου παραμένουν στην πλειοψηφία τους επιμηκυσμένα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η PpiC σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της ZipA, αφού φαίνεται η αρνητική επίδραση της PpiC επί της ανασταλτικής δραστηριότητας της ZipA στη κυτταρική διαίρεση όταν υπερεκφράζεται.

Επίσης, από την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*ftsK*) και *ΔppiC(ftsK)* (Εικόνα Γ.1.23.Γ), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της FtsK κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας μετρίου μεγέθους κύτταρα, που φέρουν μεγάλα έγκλειστα σωμάτια υποδεικνύοντας συσσωμάτωση λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Η υπερέκφραση της FtsK προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων (Draپر et al., 1998). Κατά τη στατική φάση ανάπτυξης όταν η FtsK υπερεκφράζεται στο στέλεχος BW25113(*ftsK*) τα κύτταρα παραμένουν μετρίου μεγέθους, ενώ συνεχίζουν να φέρουν μεγάλα έγκλειστα σωμάτια. Αντίθετα, τα κύτταρα του στελέχους *ΔppiC(ftsK)* εμφανίζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία, υποστηρίζοντας ότι η PpiC σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της FtsK ενώ πιθανώς να λειτουργεί προστατευτικά, βοηθώντας στην ορθή αναδίπλωση της FtsK.

Τέλος, όταν υπερεκφράζουμε τις MinC, SurA και FtsQ τόσο στο στέλεχος αγρίου τύπου όσο και στο στέλεχος *ΔppiC* δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στην κυτταρική μορφολογία τους, υποδηλώνοντας ότι πιθανώς η PpiC δε εμπλέκεται στη ρύθμιση κάποιας από αυτές, στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την ιδέα ότι η PpiC σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης ή σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της κυτταρικής διαίρεσης ρυθμίζοντας κάποιες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτήν.

### **Γ.1.9.2 Ο ρόλος της PpiC στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση**

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης της PpiC στη ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση, εξετάστηκε η ενδοκυτταρική

τοποθέτηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση, ώστε να ανιχνευθεί η όποια μεταβολή στην τοποθέτησή τους απουσία ή παρουσία της PpiC. Για αυτόν το σκοπό, παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα παραπάνω στελέχη που φέρουν επίτοπο της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού.

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 ανάπτυξης. Στην Εικόνα Γ.1.24. απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των παρακάτω στελεχών: BW25113, *ΔppiC*, BW25113(*ftsZ.GFP*), *ΔppiC(ftsZ.GFP)*, BW25113(*zipA.GFP*), *ΔppiC(zipA.GFP)*, BW25113(*minC.GFP*), *ΔppiC(minC.GFP)*, BW25113(*ftsK.GFP*), *ΔppiC(ftsK.GFP)*, BW25113(*sulA.GFP*), *ΔppiC(sulA.GFP)*, BW25113(*ftsQ.GFP*), *ΔppiC(ftsQ.GFP)*.

Από την κυτταρική μορφολογία του στελέχους BW25113(*ftsZ.GFP*) παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης FtsZ προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και σχηματισμό επιμηκυμένων κυττάρων. Ενώ όπως τονίστηκε η λειτουργία της απαιτείται για την κυτταρική διαίρεση ωστόσο η αυξημένη έκφραση της FtsZ μπορεί να προκαλέσει επιμήκυνση των κυττάρων (Ward and Lutkenhaus, 1985). Επίσης, παρατηρείται ότι εκτός από την τυπική ενδοκυτταρική της τοποθέτηση στα διαφράγματα με τη μορφή δακτυλίου, εμφανίζει και μια εκτεταμένη ελικοειδή μορφή καθ'όλο το μήκος των κυττάρων (Ma et al., 1996; Hale and Boer, 1997; Mileykovskaya et al., 1998; Fu et al., 2010). Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης και τοποθέτησης της από τους Z-δακτυλίους (στο κέντρο των κυττάρων) στην ελικοειδή μορφή, είναι μια δυναμική διαδικασία (Sun and Margolin, 1998; Ben-Yehuda and Richard Losick, 2002; Thanedar and Margolin, 2004). Όταν εκφράζεται στο στέλεχος *ΔppiC(ftsZ.GFP)*, παρατηρούνται λιγότερα επιμηκυμένα κύτταρα και διαμόρφωση της *EcftsZ* σε Z-δακτυλίου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η PpiC σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της FtsZ ενώ η απουσία της δεν επηρεάζει την ενδοκυτταρική της τοποθέτηση.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η υπερέκφραση της ZipA αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση προκαλώντας σχηματισμό επιμηκυμένων κυττάρων και τοποθετείται ενδοκυτταρικά στη μεμβράνη σε πιθανές θέσεις εντοπισμού του Z-δακτυλίου (Mileykovskaya et al., 1998; Hale and Boer, 1997; Hale and Boer, 1999). Η κυτταρική μορφολογία του στελέχους BW25113(*zipA.GFP*) χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη επιμήκυνση των κυττάρων και υποδεικνύει ένα πρότυπο εντοπισμού της ZipA σε διάσπαρτα σημεία κατά μήκος της περιφέρειας των κυττάρων, καθώς και στους κυτταρικούς πόλους. Όταν εκφράζεται στο στέλεχος *ΔppiC(zipA.GFP)* συνεχίζει η υπερέκφρασή της να προκαλεί επιμηκυμένα κύτταρα, ωστόσο η αρνητική επίδραση της PpiC στη λειτουργία της ZipA υποστηρίζεται περαιτέρω αφού η PpiC επιδρά στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση της ZipA. Φαίνεται ότι η απουσία της παρβουλίνης σταθεροποιεί καλύτερα την ενδοκυτταρική τοποθέτηση της ZipA σε διάσπαρτα σημεία κατά μήκος της περιφέρειας των κυττάρων.

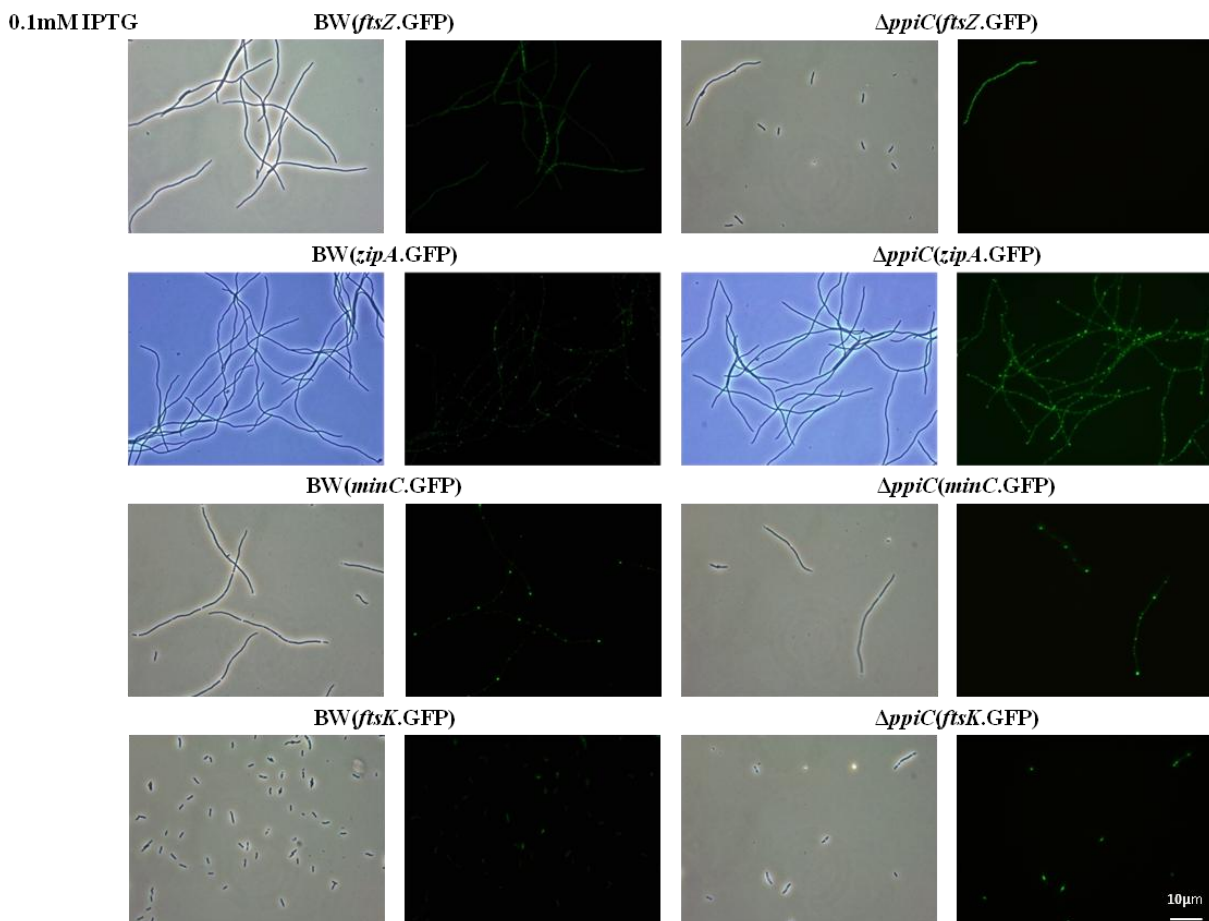
Στο *E. coli*, η MinC εντοπίζεται κυρίως στους πόλους, δεδομένου ότι αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που δημιουργούν μια διαβάθμιση συγκέντρωσης της MinC που είναι χαμηλότερη στο κέντρο του κυττάρου (Monahan and Harry, 2012) και αναστείλει τη συναρμολόγηση των πολυμερών FtsZ (Shiomi and Margolin, 2007). Από την κυτταρική μορφολογία του στελέχους BW25113(*minC.GFP*) παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MinC όπως αναμένεται αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας επιμηκυμένα και ελαφρώς επιμηκυμένα κύτταρα (Ramirez-Arcos et al., 2004), ενώ ενδοκυτταρικά δε μπορέσαμε να παρατηρήσουμε τοποθέτησή της στους πόλους (Ramirez-Arcos et al., 2001; Ramirez-Arcos et al., 2004; Hu and Lutkenhaus, 1999). Πιθανώς, αυτό να οφείλεται σε λάθος στοιχειομετρία του Min συστήματος. Τον ίδιο φαινότυπο εμφανίζει και όταν εκφράζεται στο στέλεχος



$\Delta ppiC(minC.GFP)$ , υποδηλώνοντας ότι η λειτουργία και η ενδοκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης MinC δεν ρυθμίζεται από την PpiC και επομένως δεν επηρεάζεται από την απουσία της.

Ακόμα, η υπερέκφραση της FtsK στο στέλεχος BW25113(*ftsK.GFP*) αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας ελαφρώς επιμηκυσμένα κύτταρα, αφού όπως αναφέρθηκε η υπερέκφραση της FtsK προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων (Draeger et al., 1998). Επίσης, τα κύτταρα φέρουν μεγάλα έγκλειστα σωματίδια υποδεικνύοντας συσσωμάτωση λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Την ίδια κυτταρική μορφολογία εμφανίζει και η υπερέκφραση της FtsK στο στέλεχος  $\Delta ppiC(ftsK.GFP)$ , παρατήρηση που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης FtsK δεν ρυθμίζεται από την PpiC στην εκθετική φάση ανάπτυξης και επομένως δεν επηρεάζεται από την απουσία της.

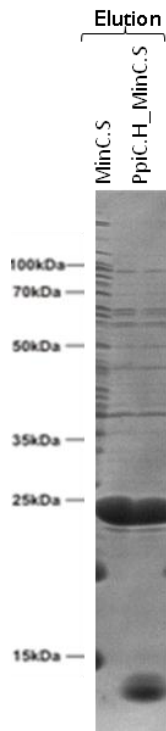
Τέλος, στην περίπτωση της SulA και της FtsQ δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα, αφού το σήμα φθορισμού της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης ήταν περιορισμένο τόσο στην υπερέκφρασή τους στο στέλεχος αγρίου τύπου όσο και στο στέλεχος  $\Delta ppiC$ .



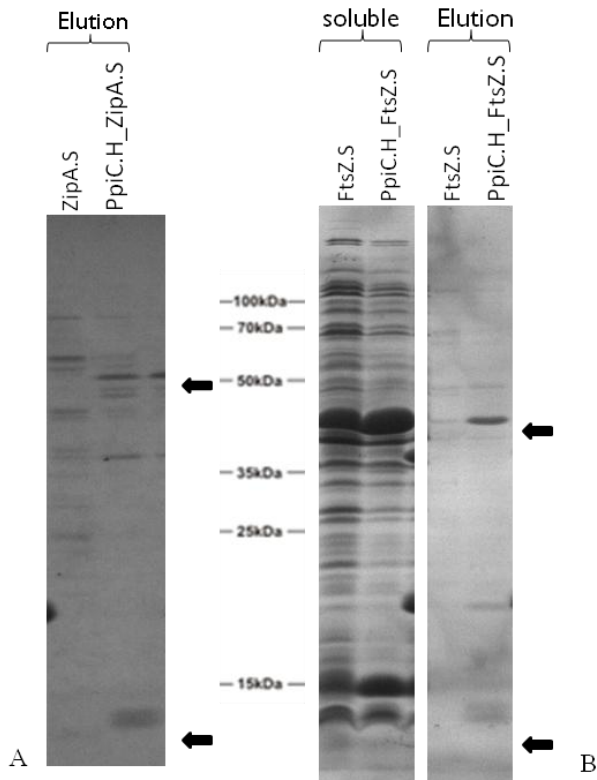
**Εικόνα Γ.1.24.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta ppiC$ , BW25113(*ftsZ.GFP*),  $\Delta ppiC(ftsZ.GFP)$ , BW25113(*zipA.GFP*),  $\Delta ppiC(zipA.GFP)$ , BW25113(*minC.GFP*),  $\Delta ppiC(minC.GFP)$ , BW25113(*ftsK.GFP*),  $\Delta ppiC(ftsK.GFP)$  κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης στους 30 °C, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού, σε συγκέντρωση 0,1 mM IPTG.

### Γ.1.9.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της Pp1C με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση στο βακτήριο *E. coli*

Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν αυτές οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση αλληλεπιδρούν *in vivo* με την Pp1C. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, η συν-έκφραση της Pp1C με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1 όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3 και απομονώθηκαν με χρωματογραφία νικελίου (*Ni-resin* χρωματογραφία συγγενείας), χρωματογραφία συγγενείας δηλαδή για τον HIS επίτοπο.



**Εικόνα Γ.1.25.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Pp1C με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη MinC. Έκφραση των MinC<sub>Stag</sub>, Pp1C<sub>His</sub>-MinC<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης 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.



**Εικόνα Γ.1.26.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της PpiC με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ZipA και FtsZ. Έκφραση των: (A) ZipA<sub>Stag</sub>, PpiC<sub>His</sub>-ZipA<sub>Stag</sub> και (B) FtsZ<sub>Stag</sub>, PpiC<sub>His</sub>-FtsZ<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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.

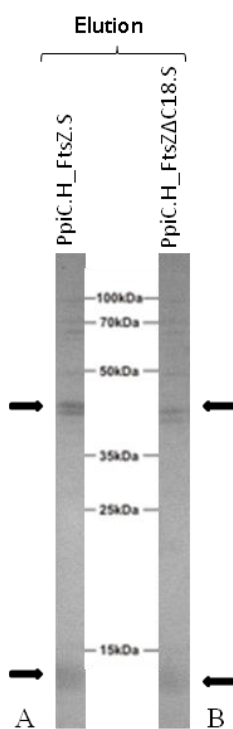
Με αυτήν τη μέθοδο όπου γίνεται εντοπισμός των σταθερών συμπλόκων πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της PpiC με τις FtsZ και ZipA όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.1.26., ενώ παρατηρήθηκε αγνώστου αιτίας δέσμευση της πρωτεΐνης MinC από τα Ni-NTA σφαιρίδια αгарόζης (Εικόνα Γ.1.25.), με συνέπεια να μην είναι δυνατό κάποιο συμπέρασμα για την αλληλεπίδραση της PpiC με την MinC.

Λόγω του κρίσιμου ρόλου της στην κυτταρική διαίρεση, η FtsZ είναι μια από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες στα βακτήρια. Αποτελείται από ένα κύριο σώμα (FtsZ 1-320 στο *E.coli*), που είναι δομικά ομόλογο της τουμπουλίνης, και ένα μη δομημένο C-τελικό άκρο (FtsZ 321-383 στο *E.coli*), το οποίο είναι λιγότερο συντηρημένο και παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις στο μήκος και την αλληλουχία του (Ma & Margolin, 1999; Lowe and Amos, 1998). Ωστόσο, έχει δείχθει ότι τα τελευταία 15-20 κατάλοιπα του C-τελικού άκρου είναι εξαιρετικά συντηρημένα στη βακτηριακή FtsZ, γεγονός που υποδηλώνει μια διατηρημένη λειτουργία για αυτήν την περιοχή. Πράγματι, το σχηματίζει μια περιοχή που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες για το σχηματισμό Z-δακτυλίου όπως είναι η FtsA, ZipA και MinC/MinD στο *E.coli* και η EzrA και SepF (Ylmf) στο *B.subtilis* (Haney et.al., 2001; Singh et al., 2008; Ishikawa et al., 2006; Shen and Lutkenhaus, 2009; Szwedziak et al., 2012).

Με σκοπό να διερευνηθεί εάν η αλληλεπίδραση της PpiC με την FtsZ επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης της παρβουλίνης στο C-τελικό άκρο της FtsZ κατασκευάστηκε μια FtsZ πρωτεΐνη που στερείται τα τελευταία 18 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο της, η FtsZΔC18, αφήνοντας ανέπαφη



την περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό της FtsZ (Wang et al., 1997) και εξετάστηκε εάν η έλλειψη της συντηρημένης αυτής αλληλουχίας επηρεάζει την αλληλεπίδραση της με την PpiC (Εικόνα Γ.1.27.). Διαπιστώθηκε, ότι η PpiC συνεχίζει να αλληλεπιδρά και με τη FtsZ $\Delta$ C18, το ποσοστό όμως της αλληλεπίδρασης μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτό της αντίστοιχης αλληλεπίδρασης με την FtsZ αγρίου τύπου επιβαιώνοντας ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και ότι το C-τελικό άκρο της FtsZ εμπλέκεται στην αποτελεσματική αναγνώριση και αλληλεπίδρασή τους. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η PpiC συνδέεται με την FtsZ με παρόμοιο τρόπο σύνδεσης με τις γνωστές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την FtsZ και πιθανώς ανταγωνίζεται με αυτές τη δέσμευση της στην FtsZ κατά την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς αποτρέπει το σχηματισμό του Z-δακτυλίου όταν απαιτείται.



**Εικόνα Γ.1.27.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της PpiC με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες FtsZ και FtsZ $\Delta$ C18. Έκφραση των: (A) PpiC<sub>His</sub>-FtsZ<sub>Stag</sub>, (B) PpiC<sub>His</sub>-FtsZ $\Delta$ C18<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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.

Διαπιστώθηκε λοιπόν (Εικόνα Γ.1.27.), ότι η PpiC συνεχίζει να αλληλεπιδρά και με τη μεταλλαγμένη FtsZ $\Delta$ C18, το ποσοστό όμως της αλληλεπίδρασης μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτό της αντίστοιχης αλληλεπίδρασης με την FtsZ αγρίου τύπου. Αυτό, επιβεβαιώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και ότι το C-τελικό άκρο της FtsZ εμπλέκεται στην αποτελεσματική αναγνώριση και αλληλεπίδραση τους.

## Γ.2 Οι κυκλοφιλίνες του *E.coli*

Οι κυκλοφιλίνες αποτελούν την οικογένεια με τη μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στις PPIάσες. Πρόκειται για πρωτεΐνες υψηλά συντηρημένες κατά την εξέλιξη, πολλές φέρουν επιπλέον και ενεργότητα τσαπερόνης και εντοπίζονται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στο μικροοργανισμό *E.coli*, μέσω της αναζήτησης στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του, εντοπίζονται δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τις κυκλοφιλίνες. Πρόκειται για τα γονίδια *pprA* (b3363/JW3326) και *pprB* (b0525/JW0514).

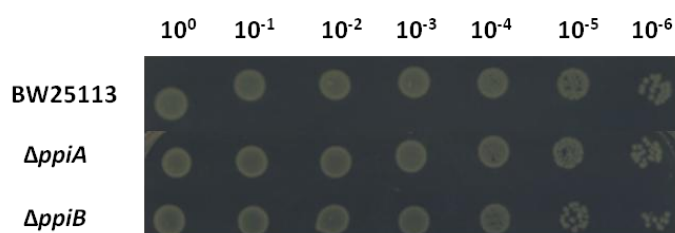
Προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των κυκλοφιλινών αποκτήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου μοντέλου *Escherichia coli*, που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις κυκλοφιλίνες *pprA*, *pprB* και μελετήθηκε ο φαινότυπός τους σε συνθήκες καταπόνησης, σε συνθήκες ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια (*Swarming*), κίνησης σε ημί-στερεό μέσο (*Swimming*) και σε συνθήκες βιοϋμενίου (*Biofilm*). Τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη είναι τα  $\Delta pprA$  και  $\Delta pprB$ .

Τα στελέχη *E. coli*, BW25113 (BW25113: *rtnB3*  $\Delta$ *lacZ4787* *hsdR514*  $\Delta$ (*araBAD*)567  $\Delta$ (*rhaBAD*)568 *rph-1*) και όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ελήφθησαν από το Stock Center *E. coli* Genetic.

### Γ.2.1 Διερεύνηση της συμμετοχής των κυκλοφιλινών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης

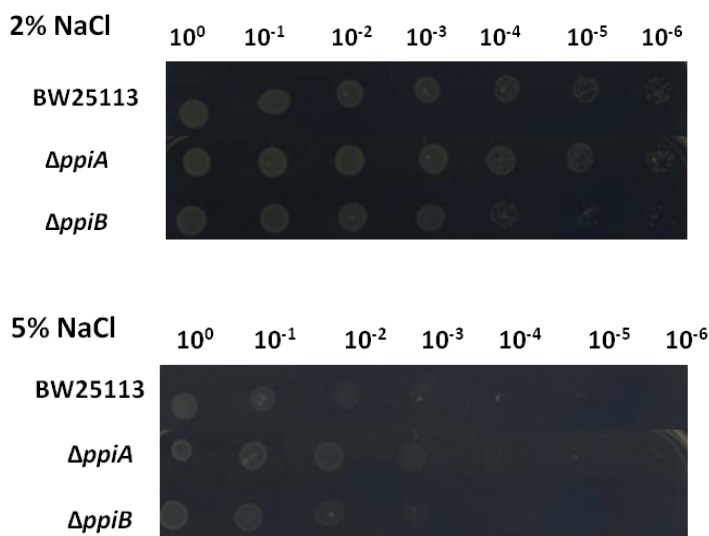
Για να διερευνηθεί η συμμετοχή των κυκλοφιλινών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη τους  $\Delta pprA$  και  $\Delta pprB$  και εξετάστηκαν ως προς την επιβιώσή τους σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (42°C) και υψηλής αλατότητας (2% και 5% NaCl). Για την μελέτη της επίδρασης στην ανάπτυξη των στελεχών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, τα στελέχη αφού αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση, στη συνέχεια εμβολιάστηκαν 5  $\mu$ l καλλιέργειας του κάθε στελεχούς αντίστοιχα, διαφόρων αραιώσεων ( $10^{-1}$  έως  $10^{-6}$ ) στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB. Τα τριβλία επώαστηκαν για 20 h στους 42 °C (Εικόνα Γ.2.1). Αντίστοιχα, για την μελέτη της επίδρασης στην ανάπτυξη των στελεχών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία εμβολιασμού στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB το οποίο σε αυτή την περίπτωση περιείχε 2% και 5% w/v χλωριούχο νάτριο. Τα τριβλία επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C (Εικόνα Γ.2.2). Η ανάπτυξη του κάθε στελεχούς συγκρίθηκε με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113.

#### Επώαση 42°C



**Εικόνα Γ.2.1.** Η επίδραση υψηλής θερμοκρασίας (42 °C) στην επιβίωση του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriA* και *ΔrriB*. Η φωτογραφία απεικονίζει την ανάπτυξη του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο LB έπειτα από επώαση 20 h, στους 42 °C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.1., διαπιστώνεται ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔrriA* παρουσιάζει σχετικά την ίδια ικανότητα επιβίωσης, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ελαφρώς μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου παρουσιάζει μόνο το στέλεχος *ΔrriB* στις δεκαδικές αραιώσεις  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$ . Συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη *EcrrpB* πιθανώς συμμετέχει στην απόκριση του μικροοργανισμού *E.coli* σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης.



**Εικόνα Γ.2.2.** Η επίδραση της υψηλής αλατότητας στην επιβίωση του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriA* και *ΔrriB*. 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.2.2 παρατηρείται ότι η επιβίωση του μεταλλαγμένου στελέχους *ΔrriB* διαφέρει ελάχιστα από αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, ενώ το στέλεχος *ΔrriA* παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η κυκλοφιλίνη *RriA* πιθανώς συμμετέχει στην απόκριση του μικροοργανισμού *E.coli* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

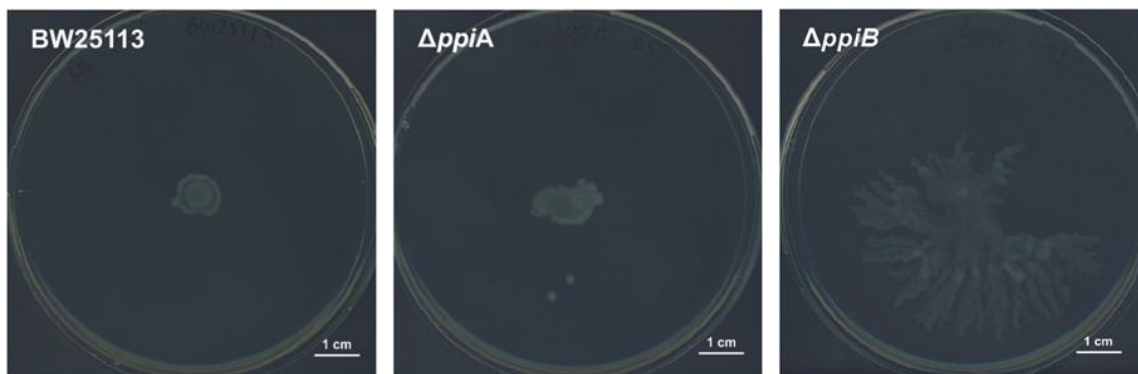
## Γ.2.2 Τα μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών επηρεάζουν την κινητικότητα των βακτηρίων και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων

Όπως έχει αναφερθεί, τα μέλη της οικογένειας των ΡΡΙΑσών αλλά και οι τσαπερόνες, πιθανότατα έμμεσα, επηρεάζουν την κινητικότητα του βακτηρίου *E. coli*, καθώς αναδιπλώνουν ή αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν ενεργά στο μηχανισμό της κινητικότητας (Inoue et al., 2007). Έτσι, προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των κυκλοφιλινών στη λειτουργία και κινητικότητα του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στέλεχη *ΔrriA* και *ΔrriB* και

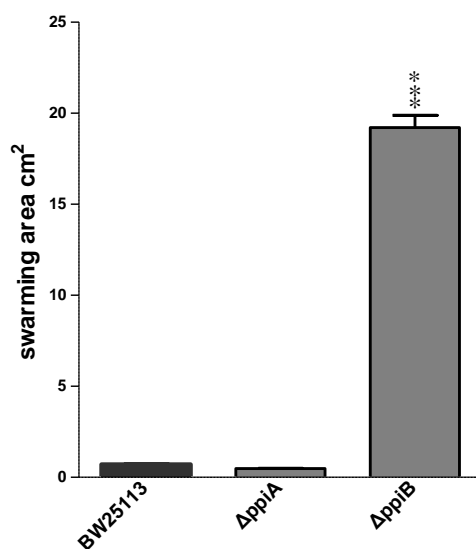
χαρακτηρίστηκε ο φαινότυπός τους σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, κολυμβητικής κίνησης και σε συνθήκες βιοϋμενίου.

### Γ.2.2.1 Ικανότητα ομαδικής κίνησης (*swarming*) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των κυκλοφιλινών

Ο ρόλος των κυκλοφιλινών στην ικανότητα ομαδικής κίνησης στο βακτήριο *E. coli* διερευνήθηκε μέσω της ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta rpiA$  και  $\Delta rpiB$  σε τρυβλία *swarming*. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση και στη συνέχεια 2  $\mu$ l εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια τρυβλίων που περιείχαν θρεπτικό υλικό LB εμπλουτισμένο με 0,5% (w/v) γλυκόζη και 0,5% (w/v) συγκέντρωσης σε άγαρ (Εικόνα Γ.2.3.). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C, στη συνέχεια μετρήθηκε η επιφάνεια που κατέλαβε ο βακτηριακός πληθυσμός και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $\text{cm}^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους για ομαδική κίνηση (Εικόνα Γ.2.4.).



**Εικόνα Γ.2.3.** Αντιπροσωπευτικά πρότυπα ομαδικής κίνησης του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών  $\Delta rpiA$  και  $\Delta rpiB$ , έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C.

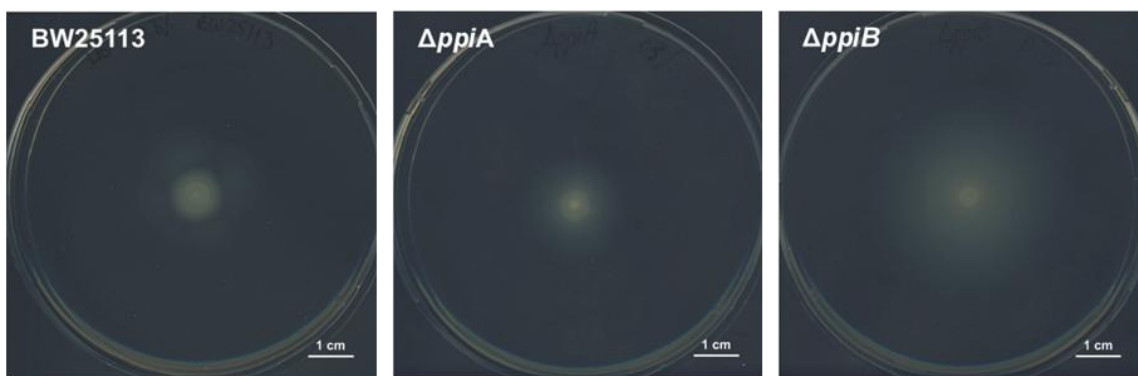


**Εικόνα Γ.2.4.** Εμβαδόν επιφάνειας του πληθυσμού του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔρριA* και *ΔρριB* σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Unpaired t Test (P<0,05).

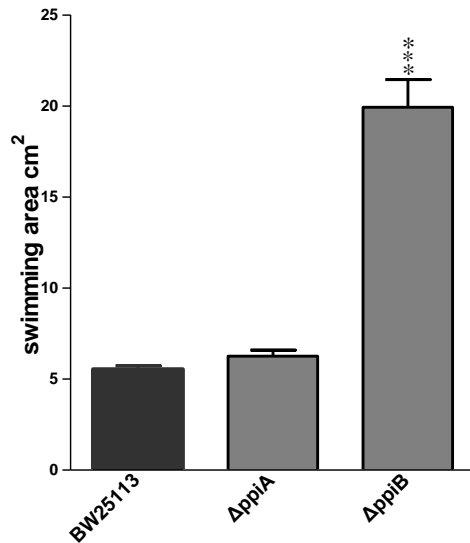
Διαπιστώνεται ότι, το στέλεχος που φέρει απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη PριB εμφανίζει αυξημένη ικανότητα ομαδικής κίνησης σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *ΔρριB* αναπτύχθηκε, σε τετραγωνικά εκατοστά, σχεδόν τριάντα φορές περισσότερο, σημειώνοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά (Unpaired t Test) (Εικόνα Γ.2.4.). Αντίθετα, το *ΔρριA* στέλεχος επέδειξε μικρότερη ικανότητα ομαδικής κίνησης, αφού ο φαινότυπος του δε διέφερε από αυτόν του αγρίου τύπου. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεραίνεται ότι η κυκλοφιλίνη PριB εμπλέκεται στην ομαδική κίνηση σε επιφάνεια ρυθμίζοντάς την αρνητικά (*negative regulator*), ενώ η κυκλοφιλίνη PριA πιθανώς δεν εμπλέκεται σε αυτήν.

### Γ.2.2.2 Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης (*swimming*) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των κυκλοφιλινών

Για να διερευνηθεί ο ρόλος των κυκλοφιλινών στην ικανότητα κολυμβητικής κίνησης στο βακτήριο *E. coli* αναπτύχθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔρριA* και *ΔρριB* σε τρυβλία *swimming*. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση και στη συνέχεια 2 μl εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια τρυβλίων που περιείχαν θρεπτικό υλικό LB και 0,3% (w/v) συγκέντρωσης σε άγαρ (Εικόνα Γ.2.5.). Τα τρυβλία επώαστηκαν για 20 h στους 30 °C, στη συνέχεια μετρήθηκε η επιφάνεια που κατέλαβε ο βακτηριακός πληθυσμός και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους για κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.2.6.).



**Εικόνα Γ.2.5.** Αντιπροσωπευτικά πρότυπα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔρριA* και *ΔρριB*, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C.

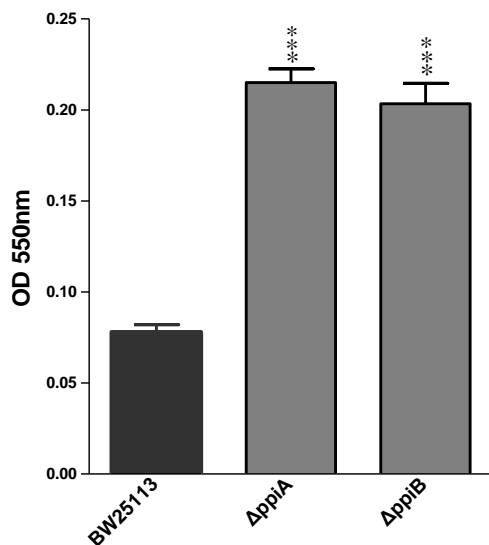


**Εικόνα Γ.2.6.** Εμβαδόν επιφάνειας του πληθυσμού του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriA* και *ΔrriB* σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης, έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46g. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 του Unpaired t Test ( $P < 0.05$ ).

Επίσης παρατηρείται, ότι μόνο το στέλεχος που φέρει απαλοιφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη *RriB* εμφανίζει αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου, ενώ το *ΔrriA* στέλεχος επέδειξε την ίδια ικανότητα κολυμβητικής κίνησης με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *ΔrriB* αναπτύχθηκε, σε τετραγωνικά εκατοστά, σχεδόν πέντε φορές περισσότερο, σημειώνοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά (Unpaired t Test ) (Εικόνα Γ.2.6.). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η κυκλοφιλίνη *RriB* εμπλέκεται στη κολυμβητική κίνηση ρυθμίζοντας την αρνητικά εφόσον απουσία της η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης αυξάνεται, ενώ η κυκλοφιλίνη *RriA* πιθανώς δεν εμπλέκεται σε αυτήν.

### Γ.2.2.3 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (*biofilm*) των μεταλλαγμένων στελεχών της οικογένειας των κυκλοφιλινών

Τέλος, η μελέτη του ρόλου των κυκλοφιλινών στο σχηματισμό βιοϋμενίου του βακτηρίου *E.coli* διερευνήθηκε μέσω της ανάπτυξης του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις κυκλοφιλίνες σε συνθήκες βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρώιμη στατική φάση και στην συνέχεια αραιώθηκαν 1:100 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και 100 μl επώαστηκαν σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.7.).



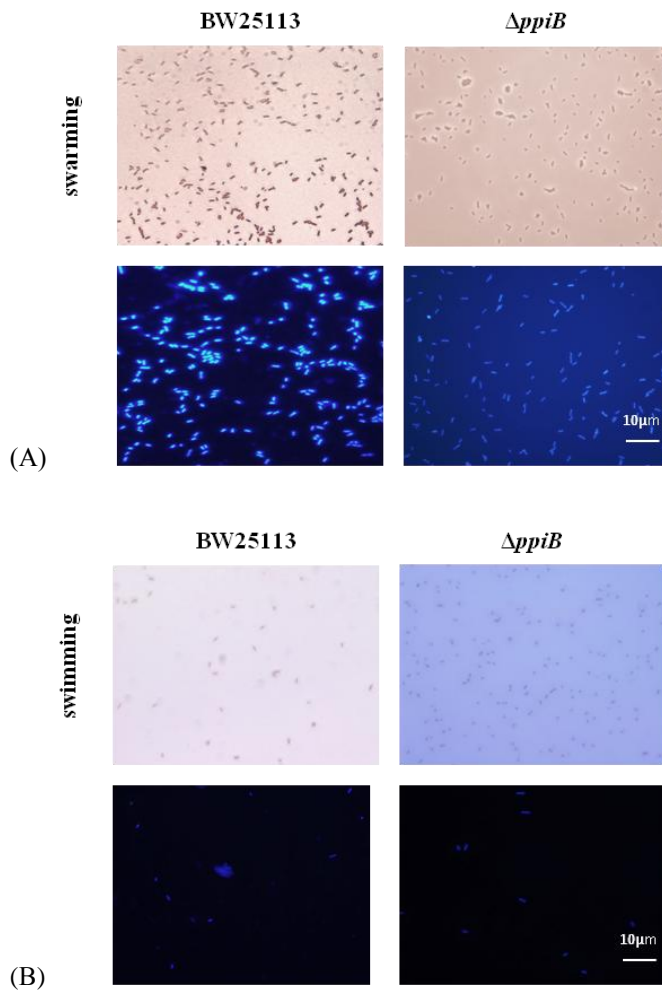
**Εικόνα Γ.2.7.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔrriA* και *ΔrriB* έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και Unpaired t Test ( $P < 0,05$ ).

Από την Εικόνα Γ.2.7. παρατηρείται ότι και τα δύο στελέχη που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις κυκλοφιλίνες, παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *ΔrriA* και *ΔrriB* παρουσιάζουν 3 φορές μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σύγκριση με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Συμπερασματικά, οι δύο κυκλοφιλίνες, P*riA* και P*riB*, εμπλέκονται στη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και πιθανώς αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της, αφού η απουσία τους προκαλεί αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

#### Γ.2.2.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας του στελέχους *ΔrriB* κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση

Όπως αναφέρθηκε αρκετοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι παρουσιάζουν την ικανότητα της ομαδικής κίνησης, μεταβάλλουν τη μορφολογία τους σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης δηλαδή εμφανίζουν μια κυτταρική επιμήκυνση (Verstraeten et al., 2008). Προκειμένου να διαπιστωθεί η οποιαδήποτε μεταβολή της κυτταρικής μορφολογίας, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία του μεταλλαγμένου στελέχους της κυκλοφιλίνης P*riB* με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Το μεταλλαγμένο στέλεχος αφού καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν 2 μl στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επώαστηκαν επί διάστημα 20 h στους 30 °C. 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 του στελέχους πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, κατά την οποία χρωματίζεται το κυτταρικό τοίχωμα με

τις χρωστικές κρυσταλλικό 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.



**Εικόνα Γ.2.8.** Κυτταρική μορφολογία του μεταλλαγμένου στελέχους  $\Delta rriB$  κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (A) και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (B) έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Από την Εικόνα Γ.2.8.A διαπιστώνεται ότι η κυτταρική μορφολογία του μεταλλαγμένου στελέχους  $\Delta rriB$  παρουσιάζει ελαφρώς επιμηκυσμένα κύτταρα συγκριτικά με τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου. Επίσης, από τη χρώση των κυττάρων με DAPI, παρατηρείται ότι τα κύτταρα του στελέχους BW25113 παρουσιάζουν ένα ή δύο πυρηνοειδή ανά κύτταρο, ενώ ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων του στελέχους  $\Delta rriB$  παρουσιάζουν τέσσερα πυρηνοειδή ανά κύτταρο, υποδεικνύοντας ότι η διαγραφή του *rriB* γονιδίου πιθανώς προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης χωρίς να επηρεάζεται η αντιγραφή του χρωμοσώματος.

Ενώ, από την Εικόνα Γ.2.8.B διαπιστώνεται ότι η κυτταρική μορφολογία του στελέχους  $\Delta rriB$ , κατά την κολυμβητική κίνηση είναι παρόμοια με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου.

Η κυτταρική μορφολογία του στελέχους  $\Delta rriA$  δεν εξετάστηκε αφού το μεταλλαγμένο στέλεχος της *RriA* δε παρουσιάζει διαφορετικό φαινότυπο από αυτόν του στελέχους αγρίου τύπου τόσο κατά την ομαδική όσο και κατά την κολυμβητική κίνηση.



### Γ.2.3 Η συμμετοχή της ενεργότητας PPIάσης και της ενεργότητας τσαπερόνης των κυκλοφιλινών στην κινητικότητα και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli*

Στη συνέχεια, με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός της δράσης των κυκλοφιλινών τόσο στην κινητικότητα όσο και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, διερευνήθηκε εάν εμπλέκεται η ενεργότητα PPIάσης αυτών των ενζύμων στους παρατηρούμενους φαινότυπους. Έτσι, δημιουργήθηκαν στελέχη τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο κάθε κυκλοφιλίνης και στην πορεία ελέγχθηκε εάν αυτά τα στελέχη συμπληρώνουν τα αντίστοιχα στελέχη *ΔppiB* και *ΔppiA* στις μελετούμενες συνθήκες.

#### Γ.2.3.1 Κατασκευή κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο PPIάσης των κυκλοφιλινών

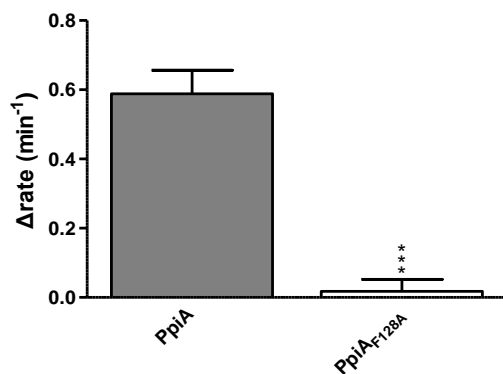
Βιβλιογραφικά και βάσει προηγούμενων κρυσταλλογραφικών μελετών της ανθρώπινης κυκλοφιλίνης A (Kallen and Walkinshaw 1992; Zydowsky et al, 1992), κατασκευάστηκαν δύο σημειακές μεταλλάξεις που μετέχουν στο ενεργό κέντρο PPIάσης της κυκλοφιλίνης PpiB και μία σημειακή μετάλλαξη που μετέχει στο ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης PpiA. Τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη στη θέση 99 και αργινίνη στη θέση 43 της PpiB, όπως επίσης και φαινυλαλανίνη στη θέση 148 της PpiA αντικαταστάθηκαν με το αμινοξύ αλανίνη. Η αντικατάσταση των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια. Για τη σημειακή μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο PPIάσης των κυκλοφιλινών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SOE. Τα μεταλλαγμένα γονίδια που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν στους φορείς pPROEX.HTa, pCDFDuet-1 και pet28A αφού προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους ώστε να πιστοποιηθεί η επιτυχής μετάλλαξη για την κάθε πρωτεΐνη.

#### Γ.2.3.2 Η κυκλοφιλίνη PpiA

##### Γ.2.3.2.1 Ενζυμική ενεργότητα της PpiA

Αρχικά πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της ενεργότητας PPIάσης της PpiA και της μεταλλαγμένης PpiA<sub>F128A</sub> (Εικόνα Γ.2.9.). Η υπερέκφραση των γονιδίων *ppiA* και *ppiA<sub>F128A</sub>* έγινε με χρήση των πλασμιδίων *ppiA<sub>His</sub>-pet28A* και *ppiA<sub>F128AHis</sub>-pet28A*, με την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης από 0,25 mM IPTG, σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Το πεπτίδιο οδηγός έχει αφαιρεθεί από τις PpiA και PpiA<sub>F128A</sub>. Η απομόνωση των διαλυτών πρωτεϊνών PpiA και PpiA<sub>F128A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Η ανίχνευση της ενεργότητας της PPIάσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-Pna (Ala, αλανίνη), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών PpiA και PpiA<sub>F128A</sub>.

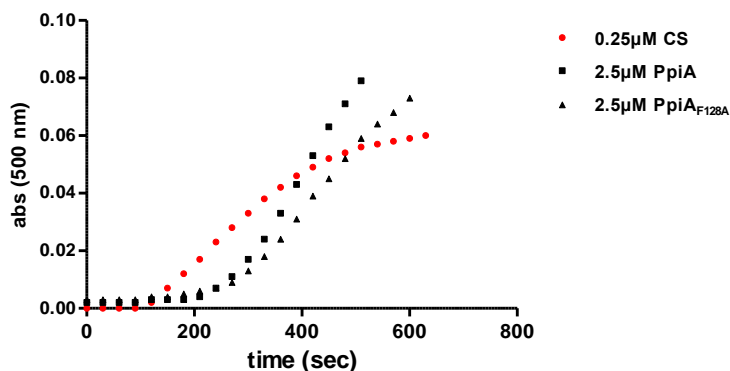
Όπως διαπιστώνεται και από το διάγραμμα της Εικόνας Γ.2.9. η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη PpiA<sub>F128A</sub> παρουσίασε μείωση της ενζυμικής της ενεργότητας κατά 97% περίπου σε σχέση με την ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου PpiA.



**Εικόνα Γ.2.9.** Η ενεργότητα PPIάσης των PpiA και PpiA<sub>F128A</sub>. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον 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, μέσω του Unpaired t test ( $P < 0.05$ ).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε εάν η σημειακή μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο PPIάσης επηρεάζει την ενεργότητα τσαπερόνης της, παρεμποδίζοντας τη δημιουργία 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 πιθανότατα έχει ενεργότητα τσαπερόνης. Η πορεία δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά στα 500 nm.

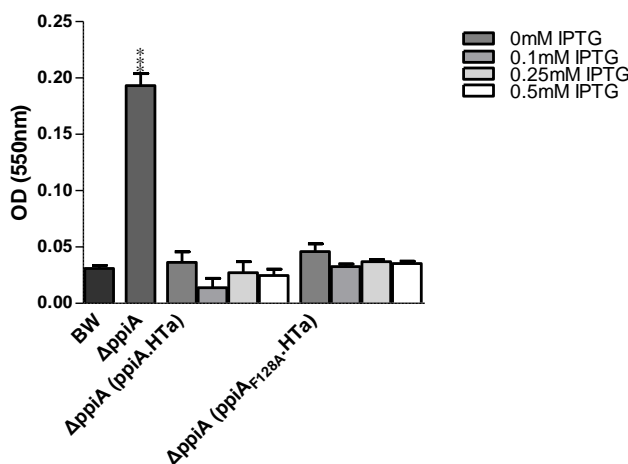
Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο πρωτεΐνες PpiA και PpiA<sub>F128A</sub> δεν παρεμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Εικόνα Γ.2.10.).



**Εικόνα Γ.2.10.** Η επίδραση των πρωτεϊνών PpiA και PpiA<sub>F128A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0,25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 2,5μM της PpiA (■), 2,5μM της PpiA<sub>F128A</sub> (▲). Η συνθάση του κιτρικού οξέος επώαστηκε στους 45 °C. Η συσσωμάτωση παρακολούθηθηκε με τη μέτρηση της θολότητας του διαλύματος στα 500 nm, απουσία και παρουσία πρόσθετων ενζύμων.

### Γ.2.3.2.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους *ΔrriA* στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια *rriA*, *rriA<sub>F128A</sub>*

Προκειμένου να μελετηθεί εάν η απουσία της ενεργότητας ΡΡΙάσης αποτελεί τον λόγο όπου το στέλεχος *ΔrriA* παρουσιάζει υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σύγκριση με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου, το *ΔrriA* στέλεχος μετασχηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *rriA<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa και *rriA<sub>F128AHis</sub>*-pPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη *ΔrriA(rriA)* και *ΔrriA(rriA<sub>F128A</sub>)*, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο φαινότυπος των νέων αυτών στελεχών για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και έτσι διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *rriA* και *rriA<sub>F128A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔrriA(rriA)* και *ΔrriA(rriA<sub>F128A</sub>)*, παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Στη συνέχεια η ικανότητα τους συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔrriA*. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.11).



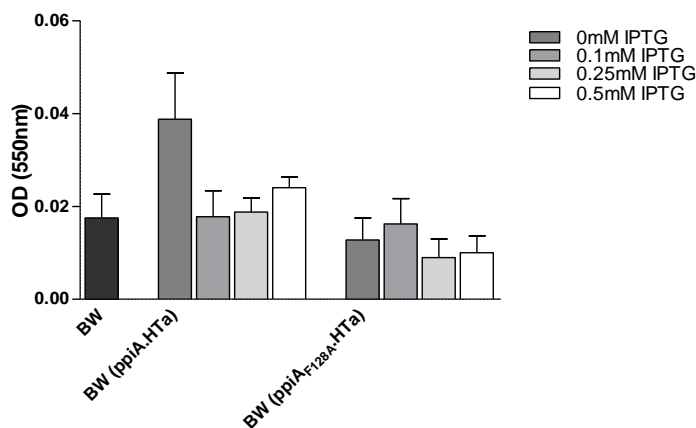
**Εικόνα Γ.2.11.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔrriA* καθώς και των στελεχών *ΔrriA(rriA)* και *ΔrriA(rriA<sub>F128A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, ενώ 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.11., συμπεραίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *rriA* προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔrriA(rriA)*. Δηλαδή η παρουσία της πρωτεΐνης ΡrriA επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου. Επίσης, παρατηρείται ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *rriA<sub>F128A</sub>* προκαλεί εξίσου επαναφορά του φαινότυπου του στελέχους αγρίου τύπου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ΡrriA είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινότυπου του αγρίου τύπου σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου και η ενεργότητα

ΡΡΙΑσης της PpiA πιθανότατα δεν σχετίζεται με τη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

### Γ.2.3.2.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια *ppiA* και *ppiA<sub>F128A</sub>*

Στη συνέχεια, εξετάστηκε και ο φαινότυπος του στελέχους αγρίου τύπου όταν υπερεκφράζονται σε αυτό τα γονίδια *ppiA* και *ppiA<sub>F128A</sub>*. Για το σκοπό αυτόν, το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113 μετασχηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *ppiA<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa και *ppiA<sub>F128AHis</sub>*-pPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*ppiA*) και BW25113(*ppiA<sub>F128A</sub>*), αντίστοιχα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο φαινότυπος των νέων αυτών στελεχών στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*ppiA*) και BW25113(*ppiA<sub>F128A</sub>*), παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Στη συνέχεια η ικανότητα τους συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και Δ*ppiA*. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.12).



**Εικόνα Γ.2.12.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*ppiA*) και BW25113(*ppiA<sub>F128A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

Από την Εικόνα Γ.2.12 παρατηρείται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *ppiA* όσο και του μεταλλαγμένου γονιδίου *ppiA<sub>F128A</sub>* στο στέλεχος BW25113 φαίνεται να μην προκαλούν σημαντική μεταβολή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως, η παρουσία της πρωτεΐνης PpiA είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου, ενώ φαίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡΙΑσης της PpiA πιθανότατα δε σχετίζεται με τη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

#### Γ.2.3.2.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων κλώνων του γονιδίου *pprA* στο βακτήριο *E. coli*

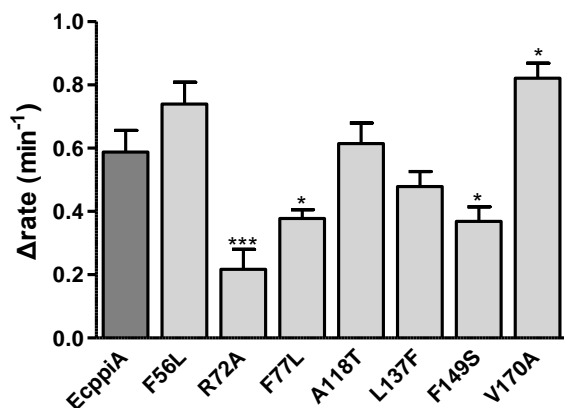
Επίσης, στα πλαίσια ερευνητικής μελέτης του εργαστηρίου ώστε να εντοπιστούν οι δομικές περιοχές της κυκλοφιλίνης PprA, οι οποίες είναι απαραίτητες για την *in vivo* δράση της ως αρνητικός ρυθμιστής της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, το γονίδιο *pprA* μεταλλάχθηκε τυχαία μέσω της τεχνικής «error prone PCR». Το *ΔpprA* στέλεχος μετασηματίστηκε με τη βιβλιοθήκη των μεταλλαγμένων *pprA* κλώνων και αναπτύχθηκε σε συνθήκες βιοϋμενίου. Επιλέχθηκαν στελέχη που παρουσίασαν συγκρίσιμη ή αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σχέση με το *ΔpprA* στέλεχος και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία των αντίστοιχων κλώνων. Οι κλώνοι που μελετήθηκαν ενζυμικά θα αναφέρονται σύμφωνα με τις μεταλλάξεις που περιέχουν.

Όλοι οι κλώνοι που προέκυψαν εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί εάν διαθέτουν ενεργότητα PPrAσης (Εικόνα Γ.2.13.) και να συγκριθεί με αυτήν που διαθέτει το στέλεχος της κυκλοφιλίνης PprA αγρίου τύπου.

Επίσης, όλοι οι κλώνοι εξετάστηκαν και ως προς την ενεργότητα τσαπερόνης, όπου παρατηρήθηκε ότι κανένας μεταλλαγμένος κλώνος δεν παρουσίασε ενεργότητα τσαπερόνης, ακριβώς όπως και το στέλεχος της κυκλοφιλίνης PprA αγρίου τύπου. Στον Πίνακα Γ.2.1., παρουσιάζεται το σύνολο των κλώνων που εξετάστηκαν.

**Πίνακας Γ.2.1.** Οι κλώνοι που μελετήθηκαν ενζυμικά παρουσιάζονται σύμφωνα με τις μεταλλάξεις που περιέχουν και αναφέρονται οι δομικές περιοχές της PprA που τοποθετείται η κάθε μετάλλαξη βάσει της τρισδιάστατης δομής της, PDB ID: 1CLH (Clubb et al., 1994).

Μετάλλαξη	Δομική περιοχή της PprA όπου τοποθετείται η μετάλλαξη
F56L	β4 πτυχωτή επιφάνεια
R72A	β4-β5 πτυχωτή επιφάνεια
F77L	β4-β5 πτυχωτή επιφάνεια
A118T	L2 βρόγχος
F128A	β7 πτυχωτή επιφάνεια
L137F	α3 έλικα
F149S	L3 βρόγχος
V170A	β8 πτυχωτή επιφάνεια



**Εικόνα Γ.2.13.** Η ενεργότητα της ΡΡΙΑ της PpiA και των μεταλλαγμένων κλώνων της. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον 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, μέσω του Unpaired t test ( $P < 0, 05$ ).

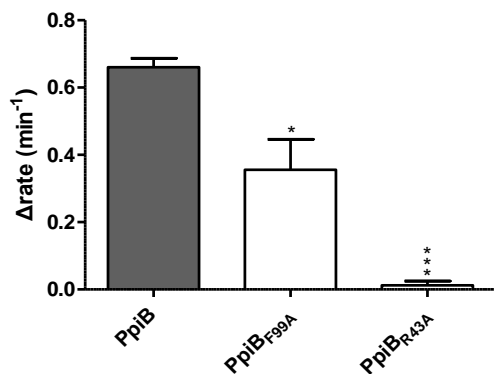
Από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.13., διαπιστώνεται ότι αρκετές μεταλλάξεις προκαλούν μείωση της ενεργότητας ΡΡΙΑ της PpiA. Διαπιστώθηκε λοιπόν, ότι οι β-πτυχωτές επιφάνειες της πρωτεΐνης είναι σημαντικές για τη διατήρηση της ενεργότητας της, αφού ο κλώνος που φέρει τη μετάλλαξη V170A μειώνει δραστικά την ενεργότητα ΡΡΙΑ της PpiA και βρίσκεται στη β8-πτυχωτή επιφάνεια. Επίσης, παρατηρείται ότι πιθανώς η περιοχή μεταξύ της β4- και β5-πτυχωτής επιφάνειας είναι σημαντική δομική περιοχή για τη διατήρηση της ενεργότητας ΡΡΙΑ της PpiA, αφού οι μεταλλάξεις R72A και F77L προκαλούν μείωση της ενεργότητας ΡΡΙΑ σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ακόμα μείωση προκαλεί η μετάλλαξη F149S που βρίσκεται στον L3-βρόγχο.

### Γ.2.3.3 Η κυκλοφιλίνη PpiB

#### Γ.2.3.3.1 Ενζυμική ενεργότητα της PpiB

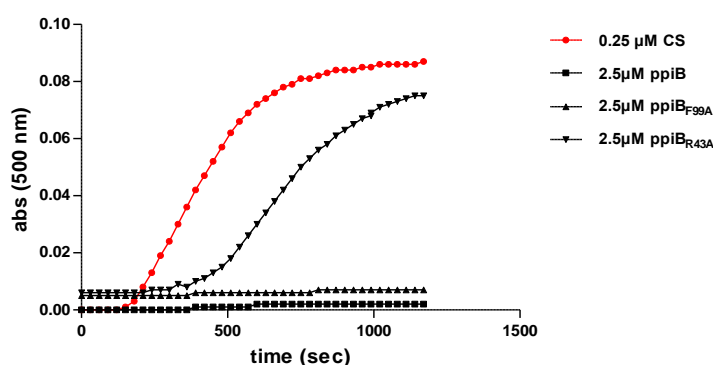
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡΙΑ της PpiB και των μεταλλαγμένων PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> (Εικόνα Γ.2.14.). Η υπερέκφραση των γονιδίων *ppiB*, *ppiB*<sub>F99A</sub> και *ppiB*<sub>R43A</sub> έγινε με χρήση των πλασμιδίων *ppiB*<sub>His</sub>-pPROEX.HTa, *ppiB*<sub>F99AHis</sub>-pPROEX.HTa και *ppiB*<sub>R43AHis</sub>-pPROEX.HTa με την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης από 0,25mM IPTG, σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η απομόνωση των διαλυτών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Η ανίχνευση της ενεργότητας ΡΡΙΑ της ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Ala, αλανίνη), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών PpiB, PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub>.

Όπως διαπιστώνεται και από το διάγραμμα της Εικόνας Γ.2.14. οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> παρουσίασαν μείωση της ενζυμικής τους ενεργότητας κατά 47% και 98% αντίστοιχα, σε σχέση με την ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης PpiB αγρίου τύπου.



**Εικόνα Γ.2.14.** Η ενεργότητα ΠΡΪάσης των PpiB, PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub>. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον 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, μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε εάν οι σημειακές μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο ΠΡΪάσης της PpiB επηρεάζουν την ενεργότητα τσαπερόνης της, παρεμποδίζοντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998). Παρατηρήθηκε (Εικόνα Γ.2.15.), ότι η πρωτεΐνη PpiB<sub>F99A</sub> διατηρεί σχεδόν ακέραιη την ικανότητά της ως παρεμποδιστής της συσσωμάτωσης της CS, ενώ αντίθετα η PpiB<sub>R43A</sub> παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη ικανότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου PpiB. Συγκεκριμένα η μείωση αυτή είναι αντίστοιχη με αυτήν που παρατηρήθηκε και στην ενεργότητα ΠΡΪάσης τους. Συμπερασματικά, η απώλεια της ενεργότητας ΠΡΪάσης της PpiB<sub>R43A</sub> επηρεάζει τη δραστηριότητά της ως παρεμποδιστή της συσσωμάτωσης της CS και πιθανότατα την λειτουργία της ως τσαπερόνη.



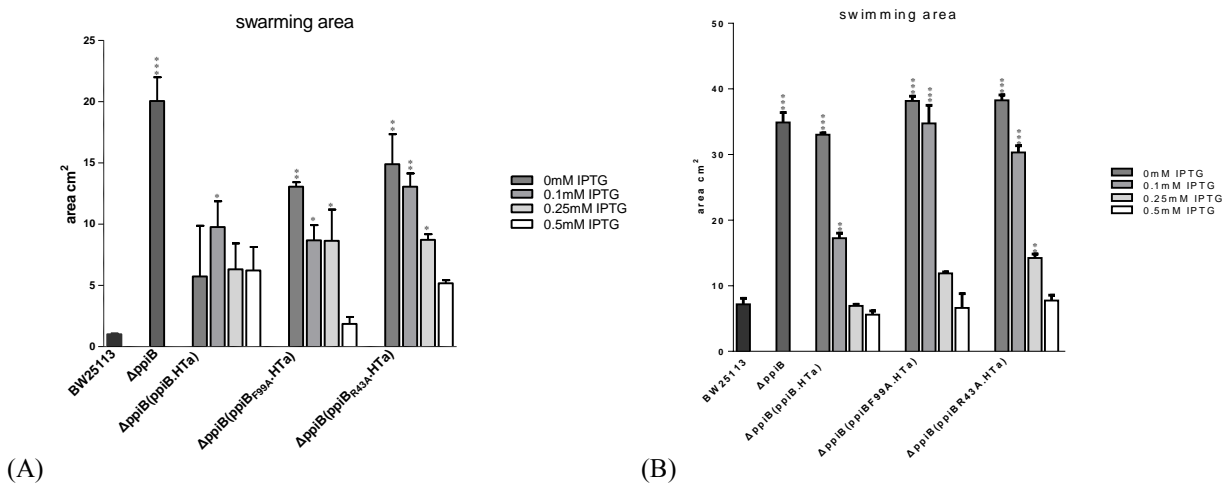
**Εικόνα Γ.2.15.** Η επίδραση των πρωτεϊνών PpiB, PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0,25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), 2,5μM της PpiB (■), 2,5μM της PpiB<sub>F99A</sub> (▲) και 2,5μM της PpiB<sub>R43A</sub> (▼). Η συνθάση του κιτρικού οξέος επώαστηκε στους 45 °C. Η συσσωμάτωση παρακολούθηθηκε με τη μέτρηση της θολότητας του διαλύματος στα 500 nm, απουσία και παρουσία πρόσθετων ενζύμων.

### Γ.2.3.3.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους $\Delta rriB$ στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια $rriB$ , $rriB_{F99A}$ και $rriB_{R43A}$

Αντίστοιχα, προκειμένου να διερευνηθεί εάν η απουσία της ενεργότητας PPIάσης αποτελεί τον λόγο όπου το στέλεχος  $\Delta rriB$  παρουσιάζει τους συγκεκριμένους φαινότυπους στις συνθήκες ομαδικής κίνησης, κολυμβητικής κίνησης και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, το  $\Delta rriB$  στέλεχος μετασηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης  $rriB_{His}$ -pPROEX.HTa,  $rriB_{F99AHis}$ -pPROEX.HTa και  $rriB_{R43AHis}$ -pPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη  $\Delta rriB(rriB)$ ,  $\Delta rriB(rriB_{F99A})$  και  $\Delta rriB(rriB_{R43A})$ , αντίστοιχα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο φαινότυπος των νέων αυτών στελεχών στις τρεις συνθήκες μελέτης.

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών  $\Delta rriB(rriB)$ ,  $\Delta rriB(rriB_{F99A})$  και  $\Delta rriB(rriB_{R43A})$ , παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Στη συνέχεια μετρήθηκε η επιφάνεια που κατέλαβε ο βακτηριακός πληθυσμός και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $cm^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους για ομαδική και κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.2.16.A και Γ.2.16.B).



**Εικόνα Γ.2.16.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113 και  $\Delta rriB$  καθώς και των στελεχών  $\Delta rriB(rriB)$ ,  $\Delta rriB(rriB_{F99A})$  και  $\Delta rriB(rriB_{R43A})$ , σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $cm^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

Από το διάγραμμα της Εικόνας Γ.2.16.A διαπιστώνεται ότι η υψηλή ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta rriB$  μειώνεται λόγω της έκφρασης του γονιδίου  $rriB$  στο στέλεχος  $\Delta rriB(rriB)$  αλλά και των γονιδίων  $rriB_{F99A}$  και  $rriB_{R43A}$ , στα στελέχη  $\Delta rriB(rriB_{F99A})$  και  $\Delta rriB(rriB_{R43A})$  αντίστοιχα. Συμπερασματικά, η παρουσία της PpiB είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου

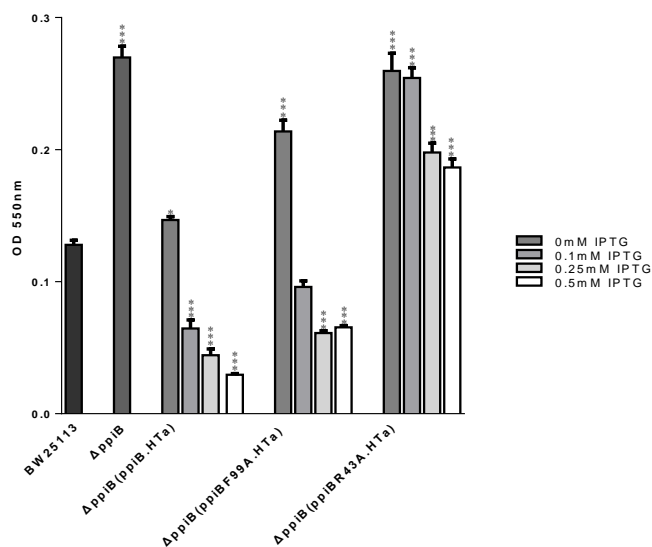


τύπου της ομαδικής κίνησης όπως επίσης η ενεργότητα PPIάσης της PpiB δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της ομαδικής κίνησης.

Επίσης, τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.16.B έδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων *ppiB*, *ppiB<sub>F99A</sub>* και *ppiB<sub>R43A</sub>* στο στέλεχος *ΔppiB* προκαλεί μείωση της ικανότητάς του για κολυμβητική κίνηση, στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η αυξημένη βιοσύνθεση της PpiB είναι υπεύθυνη για τη μείωση της κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔppiB* ενώ η ενεργότητα PPIάσης της PpiB πιθανότατα δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της κολυμβητικής κίνησης.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Κατά αναλογία και προκειμένου να διευκρινιστεί εάν η ενεργότητα PPIάσης της PpiB είναι ο λόγος όπου το στέλεχος *ΔppiB* παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, εξετάστηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *ppiB*, *ppiB<sub>F99A</sub>* και *ppiB<sub>R43A</sub>* στο στέλεχος *ΔppiB* επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *ΔppiB(ppiB)*, *ΔppiB(ppiB<sub>F99A</sub>)* και *ΔppiB(ppiB<sub>R43A</sub>)* αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια μέχρι την πρόιμη στατική φάση και στην συνέχεια αραιώθηκαν 1:100 σε υγρό θρεπτικό υλικό LB και 100 μl επώαστηκαν σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.17.).



**Εικόνα Γ.2.17.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔppiB* καθώς και των στελεχών *ΔppiB(ppiB)*, *ΔppiB(ppiB<sub>F99A</sub>)* και *ΔppiB(ppiB<sub>R43A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h, στους 30°C. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0.05).

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.17. συμπεραίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *ppiB* προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔppiB(ppiB)*. Δηλαδή η

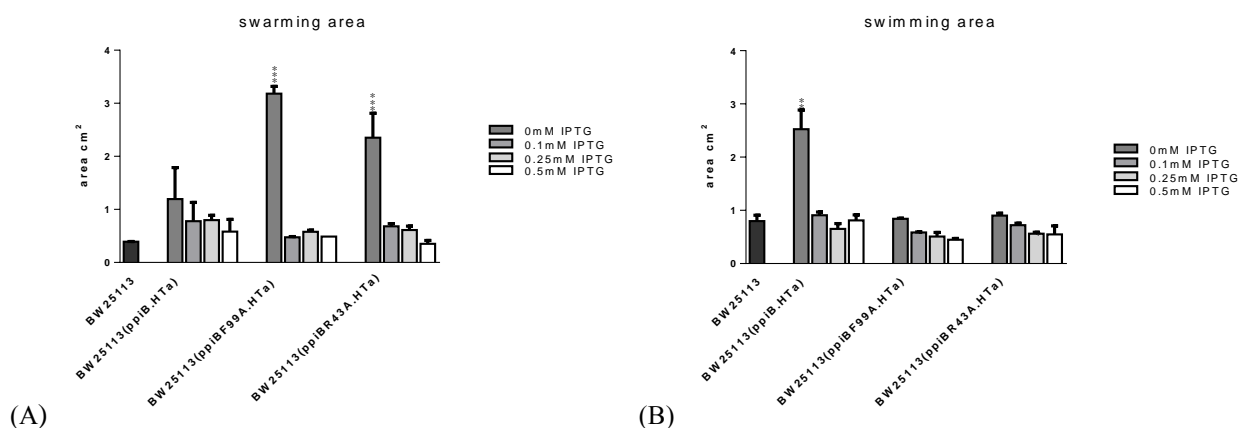
παρουσία της πρωτεΐνης Prib επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου. Επίσης, παρατηρείται ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *pprB<sub>F99A</sub>* προκαλεί εξίσου επαναφορά του φαινότυπου του στελέχους αγρίου τύπου. Αντίθετα, παρατηρείται ότι το στέλεχος *ΔpprB(pprB<sub>R43A</sub>)* διατηρεί την αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡΙΑσης της Prib πιθανώς σχετίζεται με τη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

### Γ.2.3.3.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου στο οποίο υπερεκφράζονται τα γονίδια *pprB*, *pprB<sub>F99A</sub>* και *pprB<sub>R43A</sub>*

Στη συνέχεια, εξετάστηκε και ο φαινότυπος του στελέχους αγρίου τύπου όταν υπερεκφράζονται σε αυτό τα γονίδια *pprB*, *pprB<sub>F99A</sub>* και *pprB<sub>R43A</sub>*. Για το σκοπό αυτόν, το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113 μετασχηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *pprB<sub>His</sub>-pPROEX.HTa*, *pprB<sub>F99AHis</sub>-pPROEX.HTa* και *pprB<sub>R43AHis</sub>-pPROEX.HTa* με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*pprB*) και BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*), αντίστοιχα. Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο φαινότυπος αυτών των στελεχών στις τρεις συνθήκες μελέτης.

### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113(*pprB*) και BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*), παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα του βακτηριακού πληθυσμού *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.18.A και Γ.2.18.B).



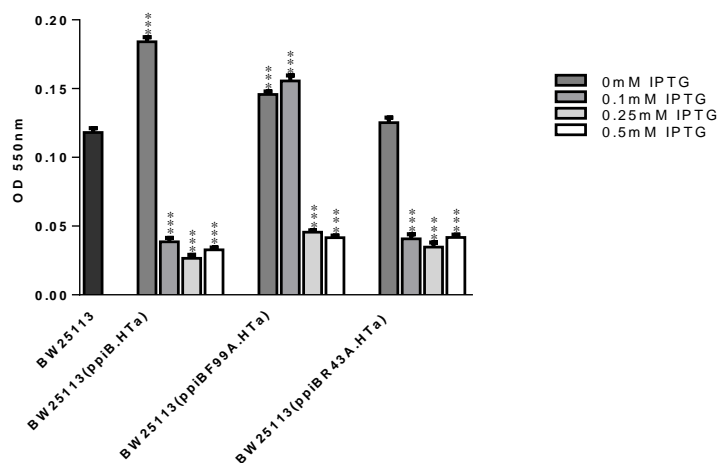
**Εικόνα Γ.2.18.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113(*pprB*) και BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0,05$ ).

Από την Εικόνα Γ.2.18.A, παρατηρείται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *ppiB* όπως και οι υπερέκφρασεις των γονιδίων *ppiB<sub>F99A</sub>* και *ppiB<sub>R43A</sub>* στο στέλεχος BW25113 φαίνεται να μην προκαλούν σημαντική μεταβολή του φαινοτύπου της ομαδικής κίνησης σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Το ίδιο παρατηρείται και στην Εικόνα Γ.2.18.B όπου η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113(*ppiB*) και BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>*) είναι παρόμοια και δεν προκαλεί μεταβολή του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου. Συμπεραίνεται ότι η παρουσία της PpiB είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου τόσο της ομαδικής κίνησης όσο και της κολυμβητικής κίνησης. Επίσης, η ενεργότητα PPIάσης της PpiB δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως αρνητικού ρυθμιστή τόσο της ομαδικής και όσο και της κολυμβητικής κίνησης.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση της ενεργότητας της PPIάσης στο σχηματισμό βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*ppiB*) και BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>*), λόγω της υπερέκφρασης των γονιδίων *ppiB* και *ppiB<sub>F99A</sub>* και *ppiB<sub>R43A</sub>*. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*ppiB*) και BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>*), παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Στη συνέχεια η ικανότητα τους συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.19.).



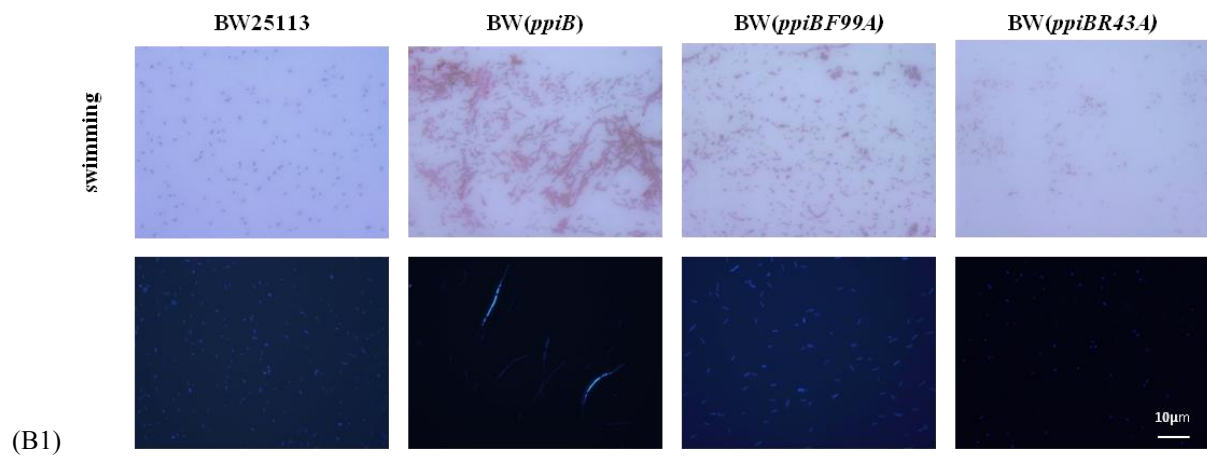
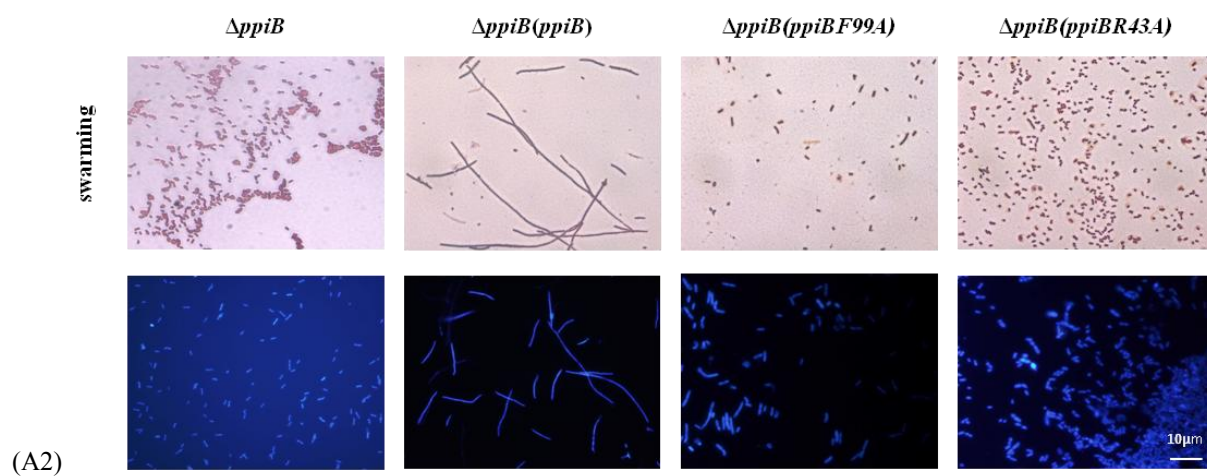
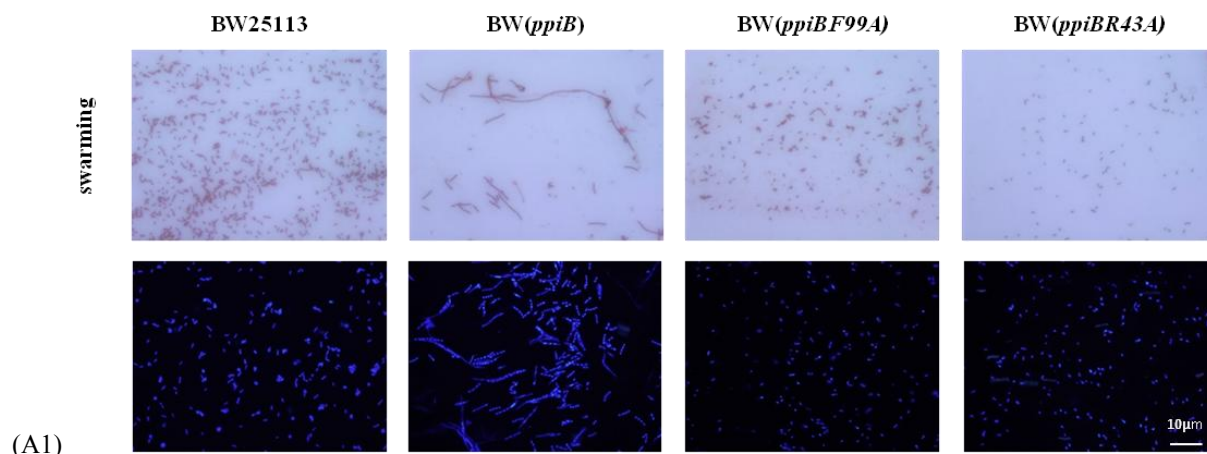
**Εικόνα Γ.2.19.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*ppiB*) και BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h, στους 30°C. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, ενώ οι μπάρες 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 Dunnett's Multiple Comparison Test ( $P < 0.05$ ).

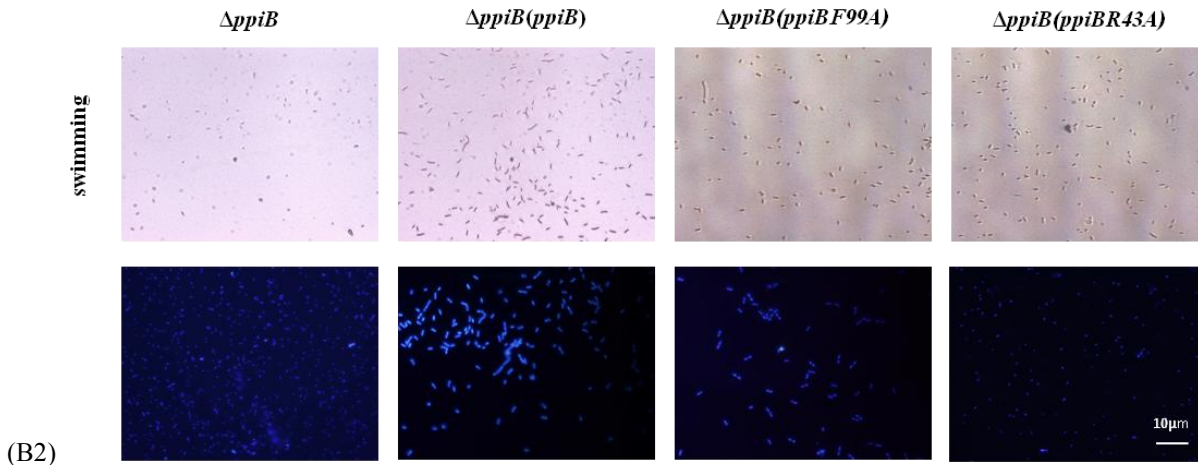
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.19. φαίνεται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *pprB* στο στέλεχος BW25113, προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Το γεγονός αυτό επαναλαμβάνεται και κατά την υπερέκφραση των γονιδίων *pprB<sub>F99A</sub>* και *pprB<sub>R43A</sub>*, όπου η αυξημένη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών PprB<sub>F99A</sub> και PprB<sub>R43A</sub> (0,25-0,5mM IPTG) στα στελέχη BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*) αντίστοιχα, προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Επομένως, η σχετικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *pprB* φαίνεται ότι προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους BW25113 ανεξάρτητα από την παρουσία ενεργότητας PPIάσης της πρωτεΐνης PprB, υποδεικνύοντας επιπλέον ότι η PprB αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του σχηματισμού βιοϋμενίου. Προφανώς, ένα συγκεκριμένο επίπεδο πρωτεΐνης PprB είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

#### **Γ.2.3.3.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113(*pprB*), BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*), BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*), Δ*pprB*(*pprB*), Δ*pprB*(*pprB<sub>F99A</sub>*) και Δ*pprB*(*pprB<sub>R43A</sub>*) κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση**

Ακολούθως, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*pprB*), BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*), όπως και των Δ*pprB*(*pprB*), Δ*pprB*(*pprB<sub>F99A</sub>*) και Δ*pprB*(*pprB<sub>R43A</sub>*), κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδιακών φορέων *pprB<sub>His</sub>*-pPROEX.HTa, *pprB<sub>F99AHis</sub>*-pPROEX.HTa και *pprB<sub>R43AHis</sub>*-pPROEX.HTa πραγματοποιήθηκε με προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0 έως 0,5 mM. Τα παραπάνω στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν (2 μl) στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επώαστηκαν στους 30 °C επί διάστημα 20 h. 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 πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, κατά την οποία χρωματίζεται το κυτταρικό τοίχωμα με τις χρωστικές κρυσταλλικό 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.2.20. ενδεικτικά παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*pprB*), BW25113(*pprB<sub>F99A</sub>*), BW25113(*pprB<sub>R43A</sub>*), Δ*pprB*(*pprB*), Δ*pprB*(*pprB<sub>F99A</sub>*) και Δ*pprB*(*pprB<sub>R43A</sub>*) έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *pprB*, *pprB<sub>F99A</sub>* και *pprB<sub>R43A</sub>* από 0,25 mM IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.





**Εικόνα Γ.2.20.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*rpiB*), BW25113(*rpiB<sub>F99A</sub>*), BW25113(*rpiB<sub>R43A</sub>*),  $\Delta rpiB$ ,  $\Delta rpiB(rpiB)$ ,  $\Delta rpiB(rpiB_{F99A})$  και  $\Delta rpiB(rpiB_{R43A})$  κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (A1), (A2) αντίστοιχα και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI (B1), (B2) αντίστοιχα, έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG.

Στην Εικόνα Γ.2.20.A1 παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*rpiB*), BW25113(*rpiB<sub>F99A</sub>*) και BW25113(*rpiB<sub>R43A</sub>*) και στην Εικόνα Γ.2.20.A2 η κυτταρική μορφολογία των στελεχών  $\Delta rpiB$ ,  $\Delta rpiB(rpiB)$ ,  $\Delta rpiB(rpiB_{F99A})$  και  $\Delta rpiB(rpiB_{R43A})$  έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *rpiB*, *rpiB<sub>F99A</sub>* και *rpiB<sub>R43A</sub>* σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG, κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram και DAPI. Διακρίνεται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *rpiB* τόσο στο στέλεχος BW25113(*rpiB*) όσο και στο στέλεχος  $\Delta rpiB(rpiB)$  προκαλεί μια έντονη κυτταρική επιμήκυνση κατά την οποία φαίνεται να έχει ανασταλεί η κυτταρική διαίρεση. Επίσης, στη κυτταρική μορφολογία των ίδιων στελεχών με χρώση DAPI, διακρίνεται ότι τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*rpiB*) 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 το διαχωρισμό της κυτταρικής μεμβράνης και τη διαίρεση των κυττάρων. Η εικόνα αυτή των κυττάρων αλλάζει όταν υπερεκφράζονται στα δύο στελέχη BW25113 και  $\Delta rpiB$ , τα γονίδια *rpiB<sub>F99A</sub>* και *rpiB<sub>R43A</sub>*, όπου τα κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο, παρόμοιο με τον αντίστοιχο του στελέχους αγρίου τύπου. Συμπεραίνεται ότι η κυτταρική επιμήκυνση των στελεχών BW25113(*rpiB*) και  $\Delta rpiB(rpiB)$  οφείλεται στα υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης *EcrpiB*, ενώ ειδικότερα είναι πιθανό να οφείλεται στην ενεργότητα ΡΡΙάσης της, αφού η παρουσία των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> παρουσιάζει την ίδια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου.

Επίσης, στην Εικόνα Γ.2.20.B1 και στην Εικόνα Γ.2.20.B2 παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των ίδιων στελεχών κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI, αντίστοιχα. Η κυτταρική μορφολογία όταν υπερεκφράζεται το γονίδιο *rpiB* είναι παρόμοια με αυτήν στην ομαδική κίνηση, όπου η υπερέκφραση του γονιδίου *rpiB* τόσο στο στέλεχος BW25113(*rpiB*) όσο και στο στέλεχος  $\Delta rpiB(rpiB)$  προκαλεί κυτταρική επιμήκυνση. Η κυτταρική μορφολογία των μεταλλαγμένων *rpiB<sub>F99A</sub>* και *rpiB<sub>R43A</sub>* κατά την κολυμβητική κίνηση παρουσιάζει παρόμοια μορφολογία με τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου.



### Γ.2.3.3.5 Βιοχημικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων κλώνων του γονιδίου *ppiB* στο βακτήριο *E. coli*

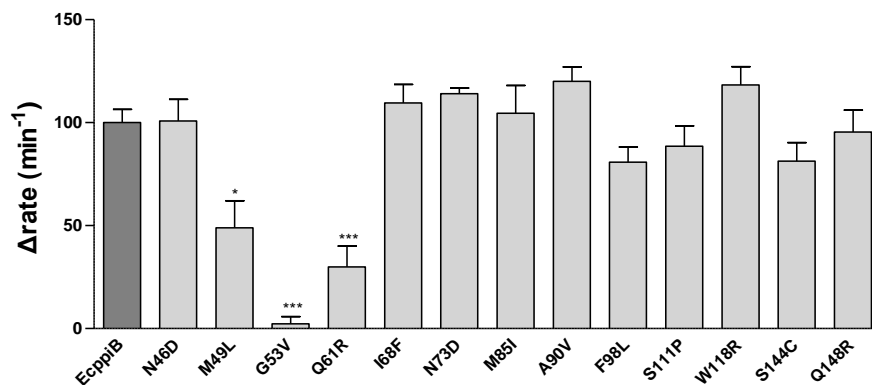
Στα πλαίσια ερευνητικής μελέτης του εργαστηρίου ώστε να εντοπιστούν οι δομικές περιοχές της κυκλοφιλίνης PpiB, οι οποίες είναι απαραίτητες για την *in vivo* δράση της ως αρνητικός ρυθμιστής της ομαδικής κίνησης, το γονίδιο *ppiB* μεταλλάχθηκε τυχαία μέσω της τεχνικής «error prone PCR». Το  $\Delta$ *ppiB* στέλεχος μετασχηματίστηκε με τη βιβλιοθήκη των μεταλλαγμένων *ppiB* κλώνων και αναπτύχθηκε σε συνθήκες ομαδικής κίνησης. Επιλέχθηκαν στελέχη που παρουσίασαν συγκρίσιμη ή αυξημένη ικανότητα ομαδικής κίνησης σε σχέση με το  $\Delta$ *ppiB* στέλεχος και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία των αντίστοιχων κλώνων. Λόγω του ότι κάποιοι από αυτούς τους κλώνους κωδικοποιούσαν για πρωτεΐνες με περισσότερες από μία αμινοξικές υποκαταστάσεις, ακολουθήθηκε η στρατηγική της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και κατασκευάστηκαν κλώνοι οι οποίοι φέρουν μοναδικές σημειακές μεταλλάξεις σε βασικές δομικές περιοχές της κυκλοφιλίνης. Οι κλώνοι που μελετήθηκαν ενζυμικά θα αναφέρονται σύμφωνα με τις μεταλλάξεις που περιέχουν.

Όλοι οι κλώνοι που προέκυψαν εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί εάν διαθέτουν ενεργότητα PPIάσης (Εικόνα Γ.2.21.) και να συγκριθεί με αυτήν που διαθέτει το στέλεχος της κυκλοφιλίνης *EcppiB* αγρίου τύπου. Για το σκοπό αυτό, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε μια ενζυμική μελέτη, όπου συνθετικά πεπτίδια της μορφής succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilides, παρουσία PPIασών ισομερειώνονται γρηγορότερα στην *trans* διαμόρφωση, η οποία αναγνωρίζεται επιλεκτικά από τη χυμοθρυψίνη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερου νιτροανιλιδίου, η συσσώρευση του οποίου μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά στα 390 nm.

Επίσης, όλοι οι κλώνοι εξετάστηκαν και ως προς την ενεργότητα τσαπερόνης, η οποία συγκρίθηκε με αυτήν που διαθέτει το στέλεχος της κυκλοφιλίνης PpiB αγρίου τύπου. Η ενεργότητα της τσαπερόνης των ανασυνδυασμένων ενζύμων υπολογίστηκε με τη μέθοδο της θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Εικόνα Γ.2.22.). Στον Πίνακα Γ.2.2., παρουσιάζεται το σύνολο των κλώνων που εξετάστηκαν.

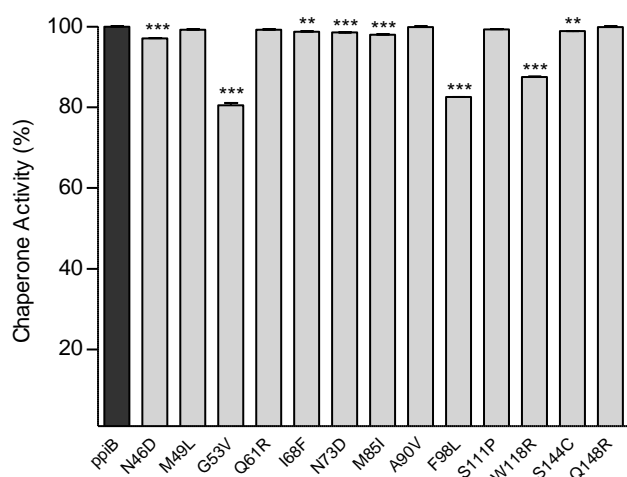
**Πίνακας Γ.2.2.** Οι κλώνοι που μελετήθηκαν ενζυμικά παρουσιάζονται σύμφωνα με τις μεταλλάξεις που περιέχουν και αναφέρονται οι δομικές περιοχές της PpiB που τοποθετείται η κάθε μετάλλαξη βάσει της τριδιάστατης δομής της PDB ID: 2NUL (Edwards et al., 1997).

Μετάλλαξη	Δομική περιοχή της PpiB όπου τοποθετείται η μετάλλαξη
N46D	β3-β4 πτυχωτή επιφάνεια
M49L	β4 πτυχωτή επιφάνεια
G53V	L1 βρόγχος
Q61R	L1 βρόγχος
I68F	L1 βρόγχος
N73D	L1 βρόγχος
M85I	β5 πτυχωτή επιφάνεια
A90V	L2 βρόγχος
F98L	β6 πτυχωτή επιφάνεια
S111P	L3 βρόγχος
W118R	L3 βρόγχος
Q148R	L4 βρόγχος
S144C	L4 βρόγχος



**Εικόνα Γ.2.21.** Η ενεργότητα ΡΡΪάσης της PpiB και των μεταλλαγμένων κλώνων της. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον 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, μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.21., δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις N46D, I68F, N73D, A90V, W118R, S144C και Q148R περιλαμβάνουν κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται περιφερικά στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος και, όπως αναμενόταν, δεν διαταράσσουν σημαντικά την ενεργότητα του ενζύμου. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι β-πτυχωτές επιφάνειες της πρωτεΐνης είναι σημαντικές για τη διατήρηση της ενεργότητας της, αφού ο κλώνος που φέρει τη μετάλλαξη M49L μειώνει δραστικά την ενεργότητα ΡΡΪάσης της PpiB και βρίσκεται στη β4-πτυχωτή επιφάνεια. Εξάλλου, είναι γνωστό ότι τα αμινοξέα M49 και F99 είναι απόλυτα συντηρημένα στις κυκλοφιλίνες και αποτελούν μέρος ενός «δυναμικού δικτύου» καταλοίπων αμινοξέων, τα οποία συμμετέχουν στην ενδομετατροπή του ενζύμου μεταξύ δύο διαμορφώσεων όπου δεσμεύονται τα *cis*- και *trans*- υποστρώματα (Eisenmesser et al., 2005, Fraser et al., 2009). Ακόμα, παρατηρείται ότι οι κλώνοι που φέρουν τις μεταλλάξεις Q61R και G53V, προκαλούν μείωση της ενεργότητας ΡΡΪάσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενδεχομένως επειδή επηρεάζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του L1-βρόχου και του πεπτιδικού υποστρώματος.



**Εικόνα Γ.2.22.** Η ενεργότητα της τσαπερόνης (σε ποσοστό) της PpiB και των μεταλλαγμένων κλώνων της. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον 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, μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).



Τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.22., δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις N46D, I68F, N73D, M85I, W118R και S144C που περιλαμβάνουν κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται περιφερικά στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος αν και δεν διαταράσσουν σημαντικά την ενεργότητα PPIάσης του ενζύμου, φαίνεται ότι μειώνουν την ενεργότητα τσαπερόνης. Επίσης, παρατηρείται ότι οι κλώνοι που φέρουν τις μεταλλάξεις G53V και F98L, προκαλούν μείωση της ενεργότητας τσαπερόνης της PpiB σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενδεχομένως επειδή επηρεάζεται η αναδίπλωση του ενζύμου. Συμπεραίνεται ότι στη δράση της PpiB είναι σημαντικά και αμινοξέα που δεν ανήκουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

#### Γ.2.4 Λειτουργική υποκατάσταση των κυκλοφιλινών από τις πεπτιδύλ-προλύλ ισομεράσες

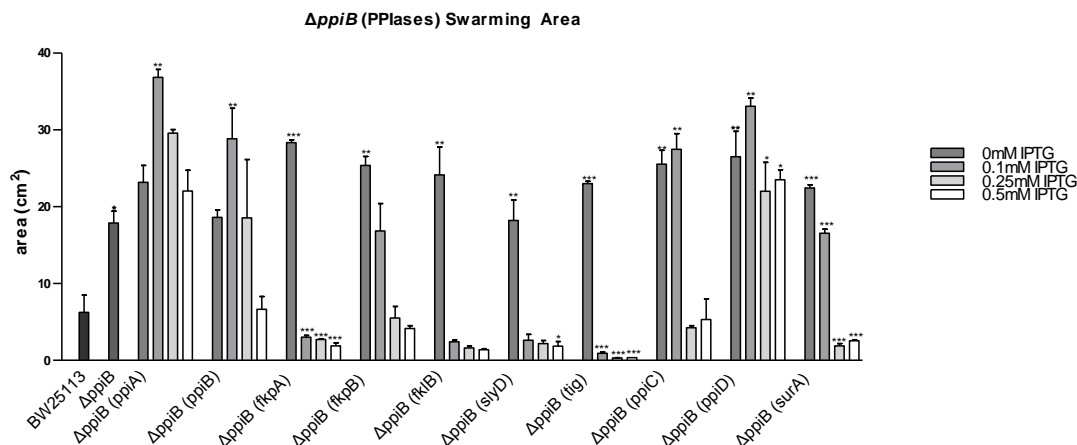
Εξαιτίας του ότι οι PPIάσες αποτελούνται από τρεις οικογένειες πρωτεϊνών με συγκλίνουσα εξέλιξη, παρουσιάζει ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η λειτουργία κάθε κυκλοφιλίνης ξεχωριστά, υποκαθίσταται από πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν και στις τρεις οικογένειες των PPIάσεων, χρησιμοποιώντας τους φαινοτύπους της ομαδικής κίνησης, της κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔppiA* και *ΔppiB*.

Για το σκοπό αυτό, όπως προαναφέρθηκε, αποκτήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pCA24N στους οποίους έχει κλωνοποιηθεί το κάθε γονίδιο που κωδικοποιεί για κάθε μέλος της υπεροικογένειας των PPIάσεων (*ppiA*, *ppiB*, *fkpA*, *fkpB*, *fkIB*, *slyD*, *tig*, *ppiC*, *ppiD* και *surA*). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *ppiA*-pCA24N, *ppiB*-pCA24N, *fkpA*-pCA24N, *fkIB*-pCA24N, *fkpB*-pCA24N, *slyD*-pCA24N, *tig*-pCA24N, *ppiC*-pCA24N, *ppiD*-pCA24N και *surA*-pCA24N εισήχθησαν ανεξάρτητα στα μεταλλαγμένα στελέχη των κυκλοφιλινών *ΔppiA* και *ΔppiB*. Όλα τα pCA24N πλασμίδια με διάφορα κλωνοποιημένα γονίδια ελήφθησαν από τη βιβλιοθήκη ASKA του NARA Institute (Kitagawa et al., 2005).

Τα στελέχη που προέκυψαν εξετάστηκαν ως προς τη δυνατότητα επαναφοράς του φαινοτύπου αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου.

#### Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των στελεχών που προέκυψαν, παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0,5 mM) και η κινητικότητα του βακτηριακού πληθυσμού *swarming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.23.).



**Εικόνα Γ.2.23.** Η λειτουργική υποκατάσταση της κυκλοφιλίνης P<sub>ri</sub>B από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIάσων, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Διακρίνεται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔrriB* καθώς και των *ΔrriB(rriA)*, *ΔrriB(rriB)*, *ΔrriB(fkpA)*, *ΔrriB(fkpB)*, *ΔrriB(fkfB)*, *ΔrriB(slyD)*, *ΔrriB(tig)*, *ΔrriB(rriC)*, *ΔrriB(rriD)* και *ΔrriB(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0,05).

Στην Εικόνα Γ.2.23. παρατηρείται ότι η αυξημένη ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔrriB* μειώνεται στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου μετά από την έκφραση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις PPIάσες της οικογένειας των FKBP's όπως και των γονιδίων *rriC* και *surA*. Ενώ, η έκφραση των υπολοίπων γονιδίων στο στέλεχος *ΔrriB* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου. Άρα, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης P<sub>ri</sub>B, κατά την ομαδική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλα τα μέλη της οικογένειας των FKBP's και από τις παρβουλίνες P<sub>ri</sub>C και SurA.

Τέλος, δε διερευνήθηκε η λειτουργική υποκατάσταση της κυκλοφιλίνης P<sub>ri</sub>A για την ομαδική κίνηση, αφού το στέλεχος *ΔrriA* σε αυτήν τη συνθήκη εμφανίζει τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος αγρίου τύπου.

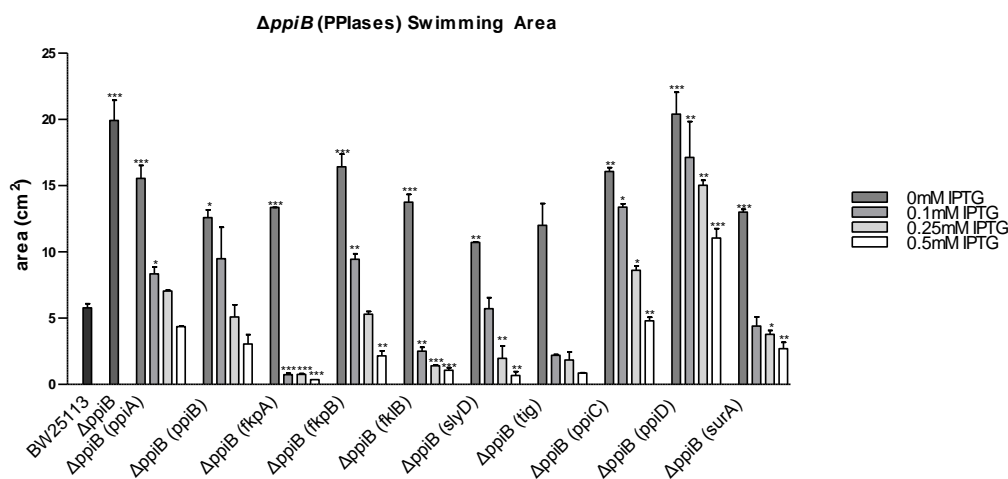
Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Γ.2.3 όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση με (+) και η μη λειτουργική υποκατάσταση με (-) της κυκλοφιλίνης P<sub>ri</sub>B από τις PPIάσες, κατά την ομαδική κίνηση.

**Πίνακας Γ.2.3.** Η λειτουργική υποκατάσταση της κυκλοφιλίνης P<sub>ri</sub>B στην ικανότητα ομαδικής κίνησης από τις υπόλοιπες PPIάσες.

Swarming	Cyps		FKBP's					Pars		
	rriA	rriB	fkpA	fkpB	fklB	slyD	tig	rriC	rriD	surA
<i>ΔrriB</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

## Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών που προέκυψαν, παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0,5 mM) και η κινητικότητα του βακτηριακού πληθυσμού *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.24.).



**Εικόνα Γ.2.24.** Η λειτουργική υποκατάσταση της κυκλοφιλίνης P<sub>ri</sub>B από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης. Διακρίνεται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών (A) BW25113, ΔrriB καθώς και των ΔrriB(rriA), ΔrriB(rriB), ΔrriB(fkrA), ΔrriB(fkrB), ΔrriB(fklB), ΔrriB(slyD), ΔrriB(tig), ΔrriB(rriC), ΔrriB(rriD) και ΔrriB(surA), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0,05).

Στην Εικόνα Γ.2.24. παρατηρείται, ότι η ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους ΔrriB μειώνεται στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου μετά από την έκφραση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις PPIάσες της οικογένειας των FKBP's όπως και των γονιδίων rriC και surA. Μείωση της κολυμβητικής κίνησης στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου προκαλεί και η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την κυκλοφιλίνη P<sub>ri</sub>A. Επομένως, η φυσιολογική λειτουργία της P<sub>ri</sub>B πρωτεΐνης, κατά την κολυμβητική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλες τις PPIάσες εκτός από την παρβουλίνη P<sub>ri</sub>D.

Επίσης, δε διερευνήθηκε η λειτουργική υποκατάσταση της κυκλοφιλίνης P<sub>ri</sub>A για την κολυμβητική κίνηση, αφού το στέλεχος ΔrriA σε αυτήν τη συνθήκη εμφανίζει τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος αγρίου τύπου.

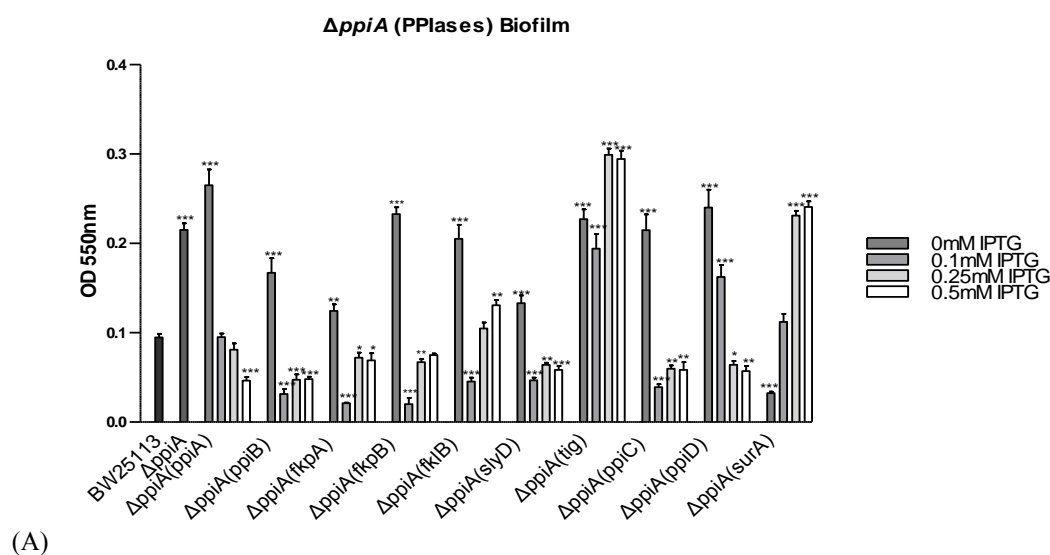
Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Γ.2.4. όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση με (+) και η μη λειτουργική υποκατάσταση με (-) της κυκλοφιλίνης *EcrpIB* από τις ΡΡΙΑσες, κατά τη κολυμβητική κίνηση.

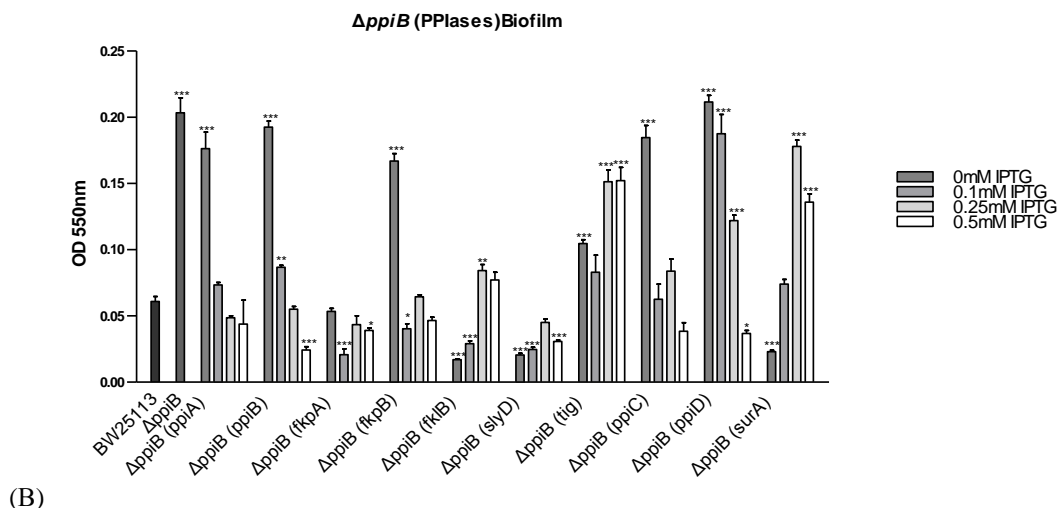
**Πίνακας Γ.2.4.** Η λειτουργική υποκατάσταση της κυκλοφιλίνης *RpiB* στην ικανότητα κολυμβητικής κίνησης από τις υπόλοιπες ΡΡΙΑσες.

<u>Swimming</u>	<u>Cygs</u>		<u>FKBPs</u>					<u>Pars</u>		
	<i>rpiA</i>	<i>rpiB</i>	<i>fkpA</i>	<i>fkpB</i>	<i>fkIB</i>	<i>slyD</i>	<i>tig</i>	<i>rpiC</i>	<i>rpiD</i>	<i>surA</i>
<i>ΔrpiB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών που προέκυψαν, παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h στους 30 °C. Στη συνέχεια η ικανότητα τους συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου. Τα προσκολλημένα στην επιφάνεια κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με τη χρωστική Crystal Violet, διαλυτοποίησή της και φωτομέτρηση αυτής στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.25.).





**Εικόνα Γ.2.25.** Η λειτουργική υποκατάσταση των κυκλοφιλινών, PpA και PpB, από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIάσεων, υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Διακρίνεται η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών: (A) BW25113, *ΔrriA* καθώς και των *ΔrriA(ppiA)*, *ΔrriA(ppiB)*, *ΔrriA(fkpA)*, *ΔrriA(fkpB)*, *ΔrriA(fklB)*, *ΔrriA(slyD)*, *ΔrriA(tig)*, *ΔrriA(ppiC)*, *ΔrriA(ppiD)* και *ΔrriA(surA)*, (B) BW25113, *ΔrriB* καθώς και των *ΔrriB(ppiA)*, *ΔrriB(ppiB)*, *ΔrriB(fkpA)*, *ΔrriB(fkpB)*, *ΔrriB(fklB)*, *ΔrriB(slyD)*, *ΔrriB(tig)*, *ΔrriB(ppiC)*, *ΔrriB(ppiD)* και *ΔrriB(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0,5 mM), έπειτα από επώαση 20 h, στους 30 °C. Το εμβαδόν της επιφάνειας που καταλαμβάνει ο πληθυσμός κάθε στελέχους μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, 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 Dunnett's Multiple Comparison Test (P<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.25.A συμπεραίνουμε ότι τη φυσιολογική ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου για την κυκλοφιλίνη PpA την υποκαθιστούν τρία μέλη της οικογένειας των FKBP, η FkpA, η FkpB, και η SlyD και η κυκλοφιλίνη PpB. Ενώ από την οικογένεια των παρβουλινών μόνο ένα μέλος δεν παρουσιάζει λειτουργική υποκατάσταση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, η SurA, αφού δεν επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου. Επομένως, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpA, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από την κυκλοφιλίνη PpB, τις FkpA, FkpB και SlyD, μέλη της οικογένειας των FKBP, και τις παρβουλίνες PpC, PpD.

Τέλος, από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.25.B συμπεραίνουμε ότι τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpB για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου την υποκαθιστούν όλα τα μέλη της οικογένειας των FKBP με εξαίρεση την TF(tig), δύο μέλη της οικογένειας των παρβουλινών η PpC και η PpD και τέλος η κυκλοφιλίνη PpA. Η PpB επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔrriB*. Οπότε, η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης PpB, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από όλες τις PPIάσεις εκτός από τις TF(tig) και SurA.

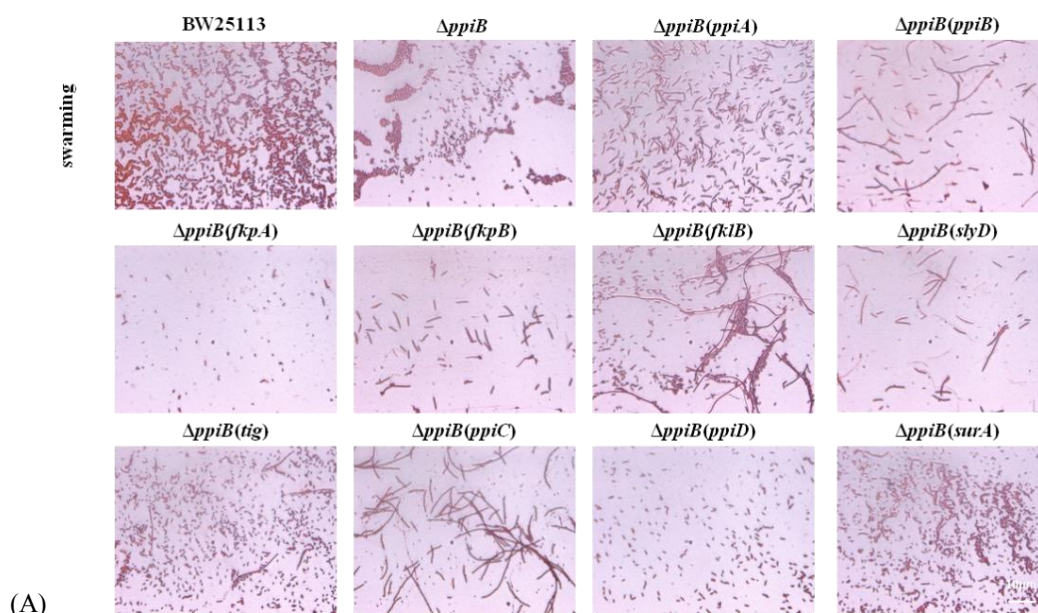
Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Γ.2.5. όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση με (+) και η μη λειτουργική υποκατάσταση με (-) των κυκλοφιλινών από τις PPIάσεις, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου.

**Πίνακας Γ.2.5.** Η λειτουργική υποκατάσταση των κυκλοφιλινών στο σχηματισμού βιοϋμενίου από τις υπόλοιπες PPIάσες.

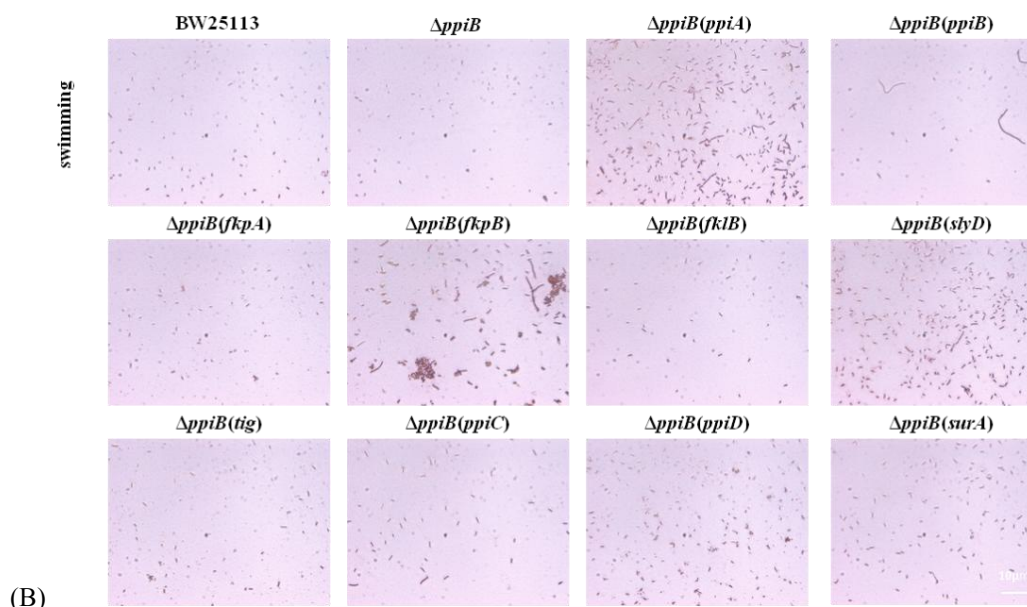
Biofilm	Cyps		FKBPs					Pars		
	ppiA	ppiB	fkpA	fkpB	fklB	slyD	tig	ppiC	ppiD	surA
$\Delta$ ppiA	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
$\Delta$ ppiB	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

### Γ.2.5 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών $\Delta$ ppiB (PPIases) κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση

Στη συνέχεια διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των διάφορων PPIασών στο μεταλλαγμένο στέλεχος της κυκλοφιλίνης PpiB επηρεάζει τη κυτταρική μορφολογία κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta$ ppiB καθώς και των  $\Delta$ ppiB(*ppiA*),  $\Delta$ ppiB(*ppiB*),  $\Delta$ ppiB(*fkpA*),  $\Delta$ ppiB(*fkpB*),  $\Delta$ ppiB(*fklB*),  $\Delta$ ppiB(*slyD*),  $\Delta$ ppiB(*tig*),  $\Delta$ ppiB(*ppiC*),  $\Delta$ ppiB(*ppiD*) και  $\Delta$ ppiB(*surA*). Τα παραπάνω στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν (2  $\mu$ l) στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επώαστηκαν επί διάστημα 20 h στους 30 °C. 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 πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, σε συγκέντρωση 0,25 mM IPTG. Η υπερέκφραση των διάφορων PPIασών στο μεταλλαγμένο στέλεχος της κυκλοφιλίνης PpiA δε διερευνήθηκε αφού το μεταλλαγμένο στέλεχος της PpiA δε παρουσιάζει διαφορετικό φαινότυπο από αυτόν του στελέχους αγρίου τύπου τόσο κατά την ομαδική όσο και κατά την κολυμβητική κίνηση.







**Εικόνα Γ.2.26.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta priB$  καθώς και των  $\Delta priB(priA)$ ,  $\Delta priB(priB)$ ,  $\Delta priB(fkpA)$ ,  $\Delta priB(fkpB)$ ,  $\Delta priB(fklB)$ ,  $\Delta priB(slyD)$ ,  $\Delta priB(tig)$ ,  $\Delta priB(priC)$ ,  $\Delta priB(priD)$  και  $\Delta priB(surA)$ , κατά την ομαδική κίνηση (A) και την κολυμβητική κίνηση (B) με χρώση Gram έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h, σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG.

Από την Εικόνα Γ.2.26.A, παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των Prib, PriA, PriC, FkpB, FklB και SlyD στο στέλεχος  $\Delta priB$  προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και οδηγεί στο σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων, κατά την ομαδική κίνηση. Ενώ, κατά την κολυμβητική κίνηση (Εικόνα Γ.2.26.B), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση των Prib και FkpB στο στέλεχος  $\Delta priB$  οδηγεί στο σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων, ενώ η υπερέκφραση των PriA και PriC στο στέλεχος  $\Delta priB$  προκαλεί μέτρια αύξηση του μεγέθους των κυττάρων. Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι η υπερέκφραση των Prib, PriA, PriC, FkpB στο στέλεχος  $\Delta priB$  προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων τόσο κατά την ομαδική κίνηση όσο και κατά την κολυμβητική. Ωστόσο, η υπερέκφραση των FklB και SlyD στο στέλεχος  $\Delta priB$  προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης μόνο κατά την ομαδική κίνηση υποδηλώνοντας ότι για την παρατηρούμενη μορφολογία δεν ευθύνεται μόνο η υπερέκφραση κάποιων συγκεκριμένων PPIασών αλλά και οι συνθήκες ανάπτυξης.

## Γ.2.6 Μελέτη των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της κυκλοφιλίνης Prib

### Γ.2.6.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων που πιθανά αλληλεπιδρούν με την Prib

Τα διάφορα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών 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. Μέσα από την εύρεση αλληλεπιδράσεων της κυκλοφιλίνης με τις πρωτεΐνες στόχους θα κατανοηθεί καλύτερα η λειτουργία της.

Αρχικά, αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων IntAct πρωτεΐνες του *E.coli*, οι οποίες πιθανά αλληλεπιδρούν με την Prib (Arifuzzaman et al., 2006). Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν οι πρωτεΐνες αυτές

βάσει των διαθέσιμων κρυσταλλικών δομών τους, διαθέτουν στην αμινοξική τους ακολουθία προλίνες που διατηρούν την *cis* διαμόρφωση. Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη προλινών που διατηρούν την *cis* διαμόρφωση σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες υποδεικνύει την πιθανή ρύθμιση της λειτουργίας του ενζύμου μέσω *cis/trans* ισομερισμού (Schmidpeter et al., 2015, Schmid 1993), έτσι ώστε η απαίτηση μιας ΡΡΙάσης μπορεί να είναι αναγκαία. Εντοπίστηκαν λοιπόν 23 πιθανές πρωτεΐνες στόχοι που περιγράφονται στον Πίνακα Γ.2.6.

**Πίνακας Γ.2.6.** Πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης PpiB (M.B.:18.51kD).

– : εντοπίζονται *cis* προλίνες στις κρυσταλλογραφικές δομές ομόλογων πρωτεϊνών του *E.coli*

\* : δεν εντοπίζονται *cis* προλίνες

Πρωτεΐνες στόχοι της PpiB	Όνομα Πρωτεΐνης	M.B.	Cis προλίνες
<b>PutA</b> (b1014/JW0999)	διεπιχειρηματική πρωτεΐνη PutA	143.83kD	-
<b>Bgal</b> (b0344/JW0335)	βήτα-γαλακτοσιδάση	116.48kD	P87, P112,P422,P596, P902
<b>RpoB</b> (b3987/JW3950)	β υπομονάδα της DNA-κατευθυνόμενης RNA πολυμεράσης	150.63kD	P43, P58, P110, P372, P489, P1181
<b>ClpX</b> (b0524/JW0513)	UDP2,3 διακυλγλυκοζαμίνη πυροφωσφοδρολάση	26.89kD	*
<b>GlpD</b> (b3426/JW3389)	γλυκερόλη-3-φωσφορική αφυδρογονάση	56.75 kD	P378
<b>YdcS</b> (b1440/JW1435)	συνθάση του πολυυδροξυβουτυρικού	42.29kD	*
<b>HflK</b> (b4174/ JW4132)	ρυθμιστής της HflB ειδικής πρωτεάσης	45.54kD	*
<b>ClpX</b> (b0438/ JW0428)	ΑΤΡάση	46.35kD	-
<b>YifE</b> (b3764/ JW3737)	συντηρημένη πρωτεΐνη της UPF0438 οικογένειας	13.13kD	*
<b>YfbU</b> (b2294/ JW2291)	συντηρημένη πρωτεΐνη της UPF0304 οικογένειας	18.23kD	-
<b>Rl14</b> (b3310/ JW3272)	50s ριβοσωμική υπομονάδα r14	13.54kD	-
<b>FucK</b> (b2803/ JW2774)	L-fuculokinase	53.23kD	P347
<b>YhjU</b> (b3538/ JW3506)	πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης	62.03kD	*
<b>HcaB</b> (b2541/ JW2525)	υδρογενάση του 2,3-διυδροξυ 2,3-διυδροφενυλπροπιονικού	28.49kD	P175
<b>DadA</b> (b1189/ JW1178)	αφυδρογονάση του D-άμινο οξέος	47.6kD	*
<b>RhsC</b> (b0700/ JW0689)	βασικό στοιχείο της RshC πρωτεΐνης	157.77kD	P299, P390
<b>RumB</b> (b0859/ JW0843)	23rRNA m(5)U747 μεθυλομεταφοράση	41.95kD	*
<b>MukB</b> (b0924/JW0907)	ΑΤΡάση DNA-δεσμευόμενη υπομονάδα	170.102kD	-

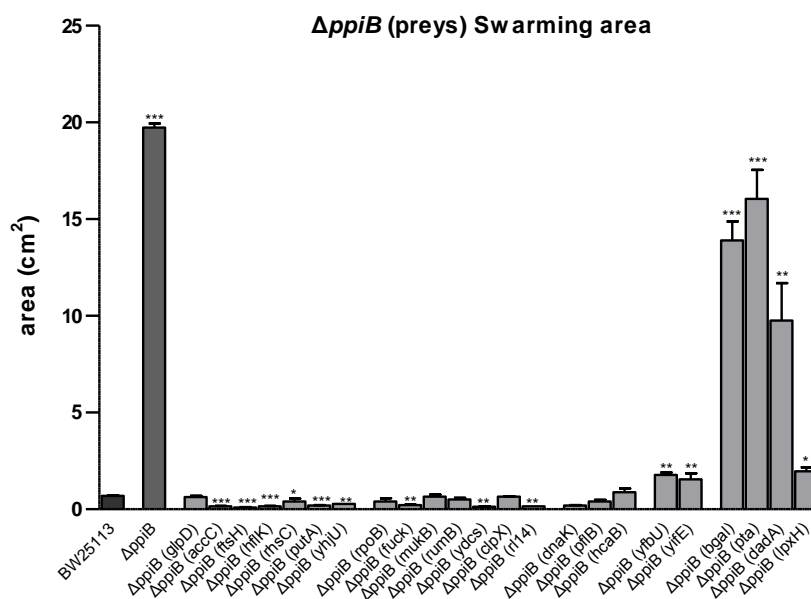


<b>FtsH</b> (b3178/JW3145)	ΑΤΡ-εξαρτώμενη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου	75,2kD	P254
<b>AccC</b> (b3256/JW3224)	καρβοξυλάση της βιοτίνης	49,32kD	P244, P155
<b>DnaK</b> (b0014/JW0013)	συνοδός πρωτεΐνη Hsp70	69,11kD	P419, P143
<b>Pta</b> (b2297/JW2294)	ακετυλομεταφοράση του φωσφορικού	77,14kD	P678
<b>PflB</b> (b0903/JW0886)	C-ακετυλομεταφοράση του μυρμηκικού	86,6kD	P370

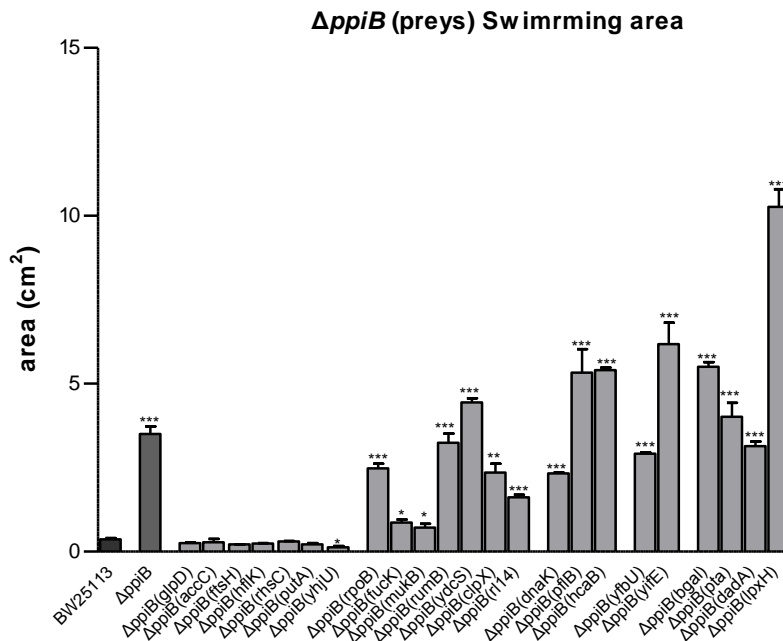
### Γ.2.6.2 Η επίδραση των πρωτεϊνών στόχων της PprIB στην κινητικότητα και στο σχηματισμό βιοϋμενίου

Προηγουμένως, δείχθηκε ότι η κυκλοφιλίνη PprIB, δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης όπως και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στο βακτήριο *E.coli*. Θέλοντας να διευκρινιστεί περαιτέρω ο τρόπος που η κυκλοφιλίνη επιφέρει αυτές τις επιπτώσεις, θεωρήθηκε ότι οι αλλαγές αυτές είναι πιθανό να επιτυγχάνονται μέσω των αλληλεπιδράσεων της PprIB με πρωτεΐνες στόχους, όπως και μέσω της μετά-μεταφραστικής ρύθμισης των λειτουργιών ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών από την PprIB.

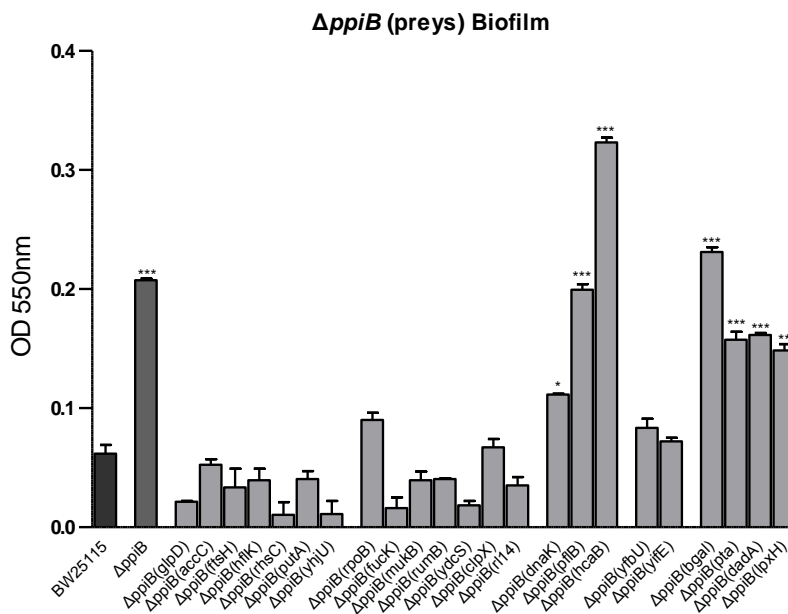
Προκειμένου να εντοπιστούν πρωτεΐνες που προκαλούν καταστολή των φαινοτύπων που παρουσιάζει το *ΔprIB* στέλεχος, εξετάστηκε εάν οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της PprIB (Πίνακας Γ.2.6.) δρουν δυνητικά αναστέλλοντας την κινητικότητα ή την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Ως εκ τούτου, υπερεκφράστηκε η καθεμία από αυτές τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους της PprIB στο *ΔprIB* στέλεχος, και ελέγχθηκε η επαναφορά των τριών φαινοτύπων στα επίπεδα άγριου τύπου. Για το σκοπό αυτόν αξιοποιήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες στόχους, τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί στο φορέα έκφρασης pCA24N.



(A)



(B)



(Γ)

**Εικόνα Γ.2.27.** Η ικανότητα ομαδικής κίνησης (A), κολυμβητικής κίνησης (B) και σχηματισμού βιοϋμενίου (Γ) των στελεχών BW25113, *ΔrpiB*, *ΔrpiB(glpD)*, *ΔrpiB(accC)*, *ΔrpiB(ftsH)*, *ΔrpiB(hflK)*, *ΔrpiB(rhsC)*, *ΔrpiB(putA)*, *ΔrpiB(yhjU)*, *ΔrpiB(rpoB)*, *ΔrpiB(fuck)*, *ΔrpiB(mukB)*, *ΔrpiB(rumB)*, *ΔrpiB(ydcS)*, *ΔrpiB(clpX)*, *ΔrpiB(r14)*, *ΔrpiB(dnaK)*, *ΔrpiB(rflB)*, *ΔrpiB(hcaB)*, *ΔrpiB(yfbU)*, *ΔrpiB(yifE)*, *ΔrpiB(bgal)*, *ΔrpiB(pta)*, *ΔrpiB(dadA)* και *ΔrpiB(lpxH)* σε συγκέντρωση 0, 25mM IPTG, έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h. 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)  $P < 0,0001$ .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.27., οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της PpiB ομαδοποιούνται σε πέντε ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από επτά πρωτεΐνες οι οποίες είναι ικανές να επαναφέρουν στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου, τόσο την ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης όσο και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι εξής: GlpD, AccC, FtsH, HflK, RhsC, PutA και YhjU. Η ομάδα αυτή φαίνεται ότι αποτελεί τη κύρια ομάδα πρωτεϊνών που όταν υπερεκφράζονται επαναφέρουν το φαινότυπο αγρίου τύπου και για τις τρεις εξεταζόμενες συνθήκες.

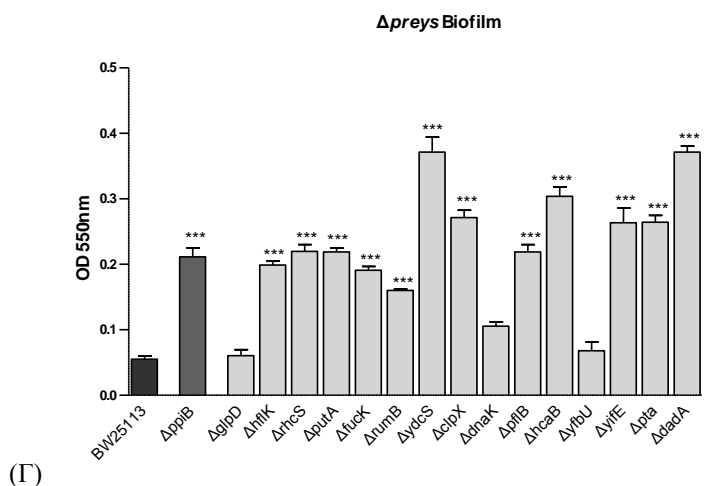
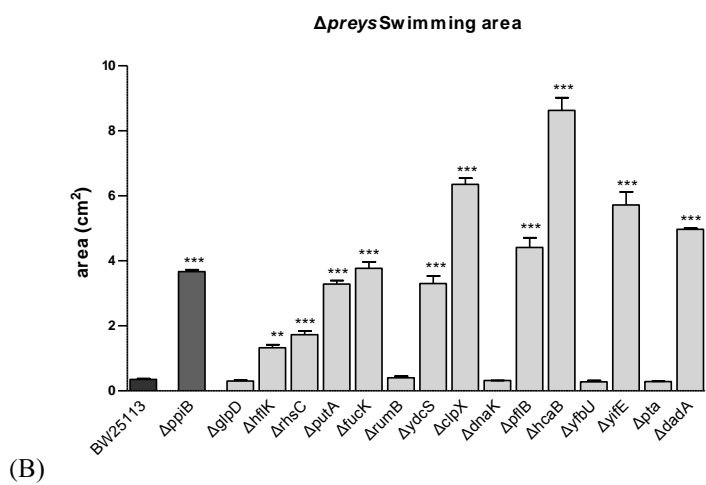
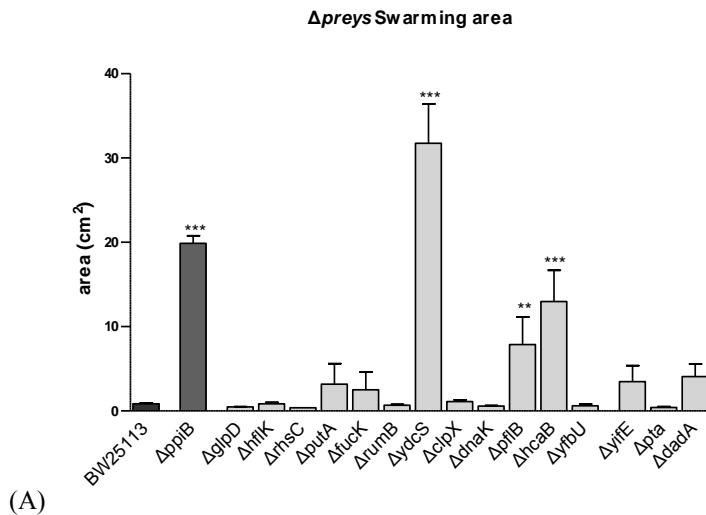
Η δεύτερη, τρίτη και τέταρτη ομάδα παρουσίασαν μεγαλύτερη εξειδίκευση. Η δεύτερη ομάδα επαναφέρει μόνο την ικανότητα ομαδικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου, και αποτελείται από τις RpoB, FucK, MukB, Rumb, YdcS, ClpX και R114. Η τρίτη ομάδα, αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες τις DnaK, PflB και HcaB οι οποίες όταν υπερεκφράζονται επαναφέρουν μόνο την ικανότητα της ομαδικής κίνησης ενώ οι YfbU και YfiE αποτελούν την τέταρτη ομάδα και επαναφέρουν μόνο την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

Η πέμπτη και τελευταία ομάδα περιλαμβάνει τις Bgal, Pta, DadA και LpxH, οι οποίες δεν επαναφέρουν το φαινότυπο του αγρίου τύπου για καμία από τις τρεις συνθήκες εξέτασης. Οι πρωτεΐνες αυτής της ομάδας πιθανώς δεν εμπλέκονται στις συγκεκριμένες διαδικασίες ή δεν αποτελούν άμεσους στόχους της PpiB σε αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης.

Στην περίπτωση που μια αντίδραση ισομερισμού της πιθανής πρωτεΐνης στόχου είναι απαραίτητη, η αφθονία της πρωτεΐνης λόγω υπερέκφρασής της σε συνδυασμό με την αργή μη καταλυόμενη ισομερείωση, θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγεί επαρκώς την παρατηρούμενη συμπληρωματικότητα στο *ΔppiB* στέλεχος. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να αναγνωρίζονται επιλεκτικά ή μη και από άλλες PPIάσες του κυττάρου, λαμβάνοντας υπόψη και την παρατηρούμενη λειτουργική συμπληρωματικότητα μεταξύ των μελών της οικογένειας των PPIάσων.

### Γ.2.6.3 Διερεύνηση της κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου των *Δ(preys)* στελεχών

Με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος της κάθε πρωτεΐνης στόχου της PpiB στη ρύθμιση της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης καθώς και στο σχηματισμό βιοϋμενίου, μελετήθηκαν στις παραπάνω συνθήκες τα στελέχη τα οποία φέρουν απαλοιφή του κάθε γονιδίου που κωδικοποιεί για τις προαναφερθείσες πιθανές πρωτεΐνες στόχους της κυκλοφιλίνης. Έτσι, εξετάστηκαν τα στελέχη *ΔglpD*, *ΔhflK*, *ΔrhsC*, *ΔputA*, *ΔfucK*, *ΔrumB*, *ΔydcS*, *ΔclpX*, *ΔdnaK*, *ΔpflB*, *ΔhcaB*, *ΔyfbU*, *ΔyifE*, *Δpta* και *ΔdadA*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου. Σημειώνεται ότι, τα στελέχη *E.coli* που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων *accC*, *ftsH*, *yhjU*, *rpoB*, *mukB*, *r114*, *bgal* και *lpxH* δεν επιβιώνουν, αφού τα γονίδια αυτά είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του βακτηρίου.



**Εικόνα Γ.2.28.** Η ικανότητα ομαδικής κίνησης (A), κολυμβητικής κίνησης (B) και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Γ) των στελεχών *ΔglpD*, *ΔhflK*, *ΔrhsC*, *ΔputA*, *ΔfucK*, *ΔrumB*, *ΔydcS*, *Δcpx*, *ΔdnaK*, *ΔpflB*, *ΔhcaB*, *ΔyfbU*, *ΔyifE*, *Δpta* και *Δdada* έπειτα από ανάπτυξη στους 30 °C για 20 h, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113. 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).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.28., πολλά από τα στελέχη που μελετήθηκαν παρουσιάζουν παρόμοιους φαινότυπους με αυτούς του στελέχους *ΔrriB* κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και το σχηματισμό βιοϋμενίου, υποδηλώνοντας ότι εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες. Κατά τη συνθήκη της ομαδικής κίνησης (Εικόνα Γ.2.28.A) φαίνεται ότι τα στελέχη *YdcS*, *ΔrflB*, *ΔhcaB* παρουσιάζουν τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος *ΔrriB*, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς οι πρωτεΐνες PflB και HcaB επιδρούν αρνητικά στην ικανότητα ομαδικής κίνησης. Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες FucK, RumB, ClpX, YfiE επιδρούν αρνητικά στη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Εικόνα Γ.2.28.Γ). Επίσης, οι πρωτεΐνες HflK, PutA, RhsC επιδρούν αρνητικά τόσο στην ικανότητα κολυμβητικής κίνησης όσο και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Εικόνας Γ.2.28.B και Γ.2.28.Γ). Τέλος, η πρωτεΐνη *YdcS* επιδρά αρνητικά στην ικανότητα ομαδικής κίνησης και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Εικόνας Γ.2.28.A και Γ.2.28.Γ). Διαπιστώθηκε ότι αρκετές πρωτεΐνες στόχοι της PflB συμμετέχουν στη ρύθμιση παρόμοιων ή παράλληλων οδών με την κυκλοφιλίνη και έτσι η απουσία τους είναι ικανή να επιδρά αρνητικά στις μελετούμενες συνθήκες και να παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος *ΔrriB*.

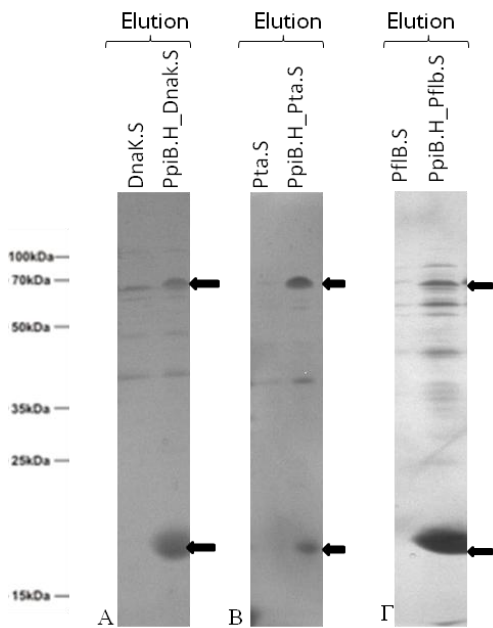
#### Γ.2.6.4 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PflB με κάποιες από τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους

Με σκοπό να διερευνηθεί εάν κάποια από τις πρωτεΐνες που μπορούν να επαναφέρουν το φαινότυπο του στελέχους *ΔrriB* αποτελούν όντως πιθανές πρωτεΐνες στόχους για την PflB, εξετάσαμε εάν η PflB αλληλεπιδρά *in vivo* με καθεμία από τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους.

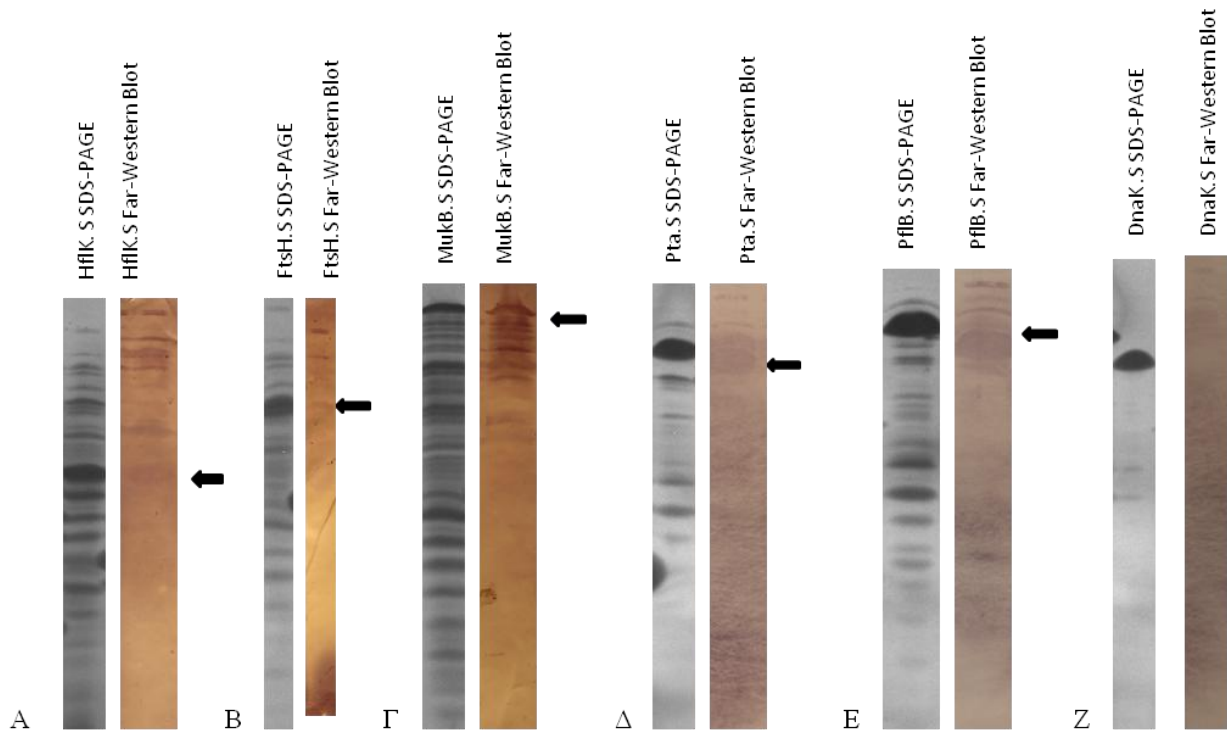
Μελετήθηκαν δεκαοχτώ πρωτεΐνες με τις οποίες πιθανόν αλληλεπιδρά η PflB: η *YdcS*, HflK, ClpX, YfiE, YFbU, R114, FucK, YhjU, HcaB, DadA, RhsC, RumB, MukB, FtsH, AccC, DnaK, PflB και η Pta (Πίνακας Γ.2.6.). Πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της PflB με τις δεκαοχτώ πιθανές πρωτεΐνες στόχους, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν με χρωματογραφία νικελίου (*Ni-resin* χρωματογραφία συγγενείας), χρωματογραφία συγγενείας δηλαδή για τον HIS επίτοπο. Η έκφραση των πρωτεϊνών έγινε σε κύτταρα *E.coli BL21 DE3*.

Με αυτήν τη μέθοδο όπου γίνεται εντοπισμός των σταθερών συμπλόκων πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, μετά από ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της PflB μόνο με τις DnaK, PflB και Pta (Εικόνα Γ.2.29.). Η αδυναμία εντοπισμού περισσότερων αλληλεπιδράσεων πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη παροδικών αλληλεπιδράσεων της PflB με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους (*transient interaction*) ή στην προτίμηση της PflB για πλήρως ή μερικώς μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στόχους.

Για αυτό το λόγο, στη συνέχεια εξετάστηκε το ενδεχόμενο η PflB να αναγνωρίζει την αποδιατεταγμένη μορφή των πρωτεϊνών στόχων και να αλληλεπιδρά μαζί τους, αφού για την αποτελεσματική αναδίπλωση των πρωτεϊνών, οι PPIάσες πρέπει να εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Schmidpeter and Schmid, 2015). Έτσι, με τη μέθοδο της overlay αποτύπωσης κατά Western (Far-Western Blot) που έχει περιγραφεί παραπάνω, επιβεβαιώθηκε αρχικά η αλληλεπίδραση της PflB με τις PflB και Pta, ενώ εντοπίστηκαν τρεις ακόμα πρωτεΐνες στόχοι που αλληλεπιδρούν με την PflB οι: HflK, FtsH και MukB (Εικόνα Γ.2.30.).



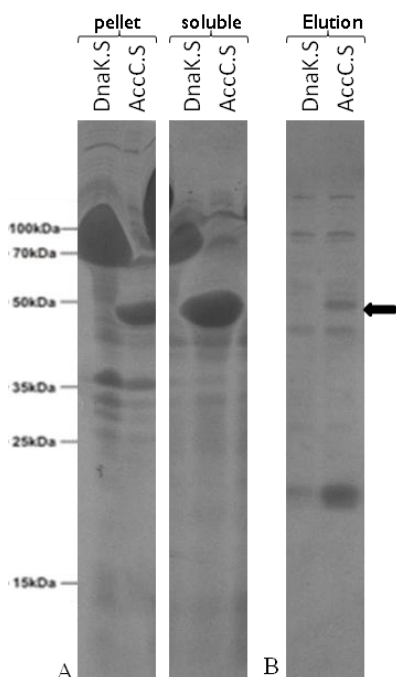
**Εικόνα Γ.2.29.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες: (Α) DnaK, (Β) Pta και (Γ) Pflb. Έκφραση των στελεχών: DnaK<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-DnaK<sub>Stag</sub>, Pta<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-Pta<sub>Stag</sub>, Pflb<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-Pflb<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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.



**Εικόνα Γ.2.30.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες HflK, FtsH, MukB, Pta και Pflb με τη μέθοδο της αποτύπωσης κατά Far-Western. Η αποτύπωση κατά Far-Western της Prib<sub>His</sub> με τις HflK<sub>Stag</sub> (Α), FtsH<sub>Stag</sub> (Β), MukB<sub>Stag</sub> (Γ) Pta<sub>Stag</sub>, (Δ) και Pflb<sub>Stag</sub> (Ε) DnaK<sub>Stag</sub>. Η έκφραση των Prib<sub>His</sub>, HflK<sub>Stag</sub>, FtsH<sub>Stag</sub>, MukB<sub>Stag</sub>, Pta<sub>Stag</sub> και Pflb<sub>Stag</sub> πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *E.coli* BL21DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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.

Η αλληλεπίδραση της Prib με την AccC επιβεβαιώθηκε με δέσμευσή της στην Prib, αφού πρώτα είχε αποδιαταχθεί. Αρχικά, η Prib<sub>His</sub> δεσμεύτηκε από τη στήλη Ni-NTA αгарόζης και στη συνέχεια η AccC που είχε αποδιαταχθεί με 8M ουρία αναδεύτηκε μαζί με την κυκλοφιλίνη στη στήλη Ni-NTA αгарόζης για μία ώρα. Τέλος, η AccC συνεκλούστηκε μαζί με την Prib. (Εικόνα Γ.2.31.).

Επίσης, συμπεραίνεται ότι η DnaK πρέπει να βρίσκεται σε φυσική (native) κατάσταση για να αλληλεπιδράσει με την Prib, αφού δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με την Prib όταν βρισκόταν σε αποδιατεταγμένη μορφή (Far-Western Blot και απομόνωση μετά από αποδιάταξη με 8M ουρία) (Εικόνα Γ.2.31.).

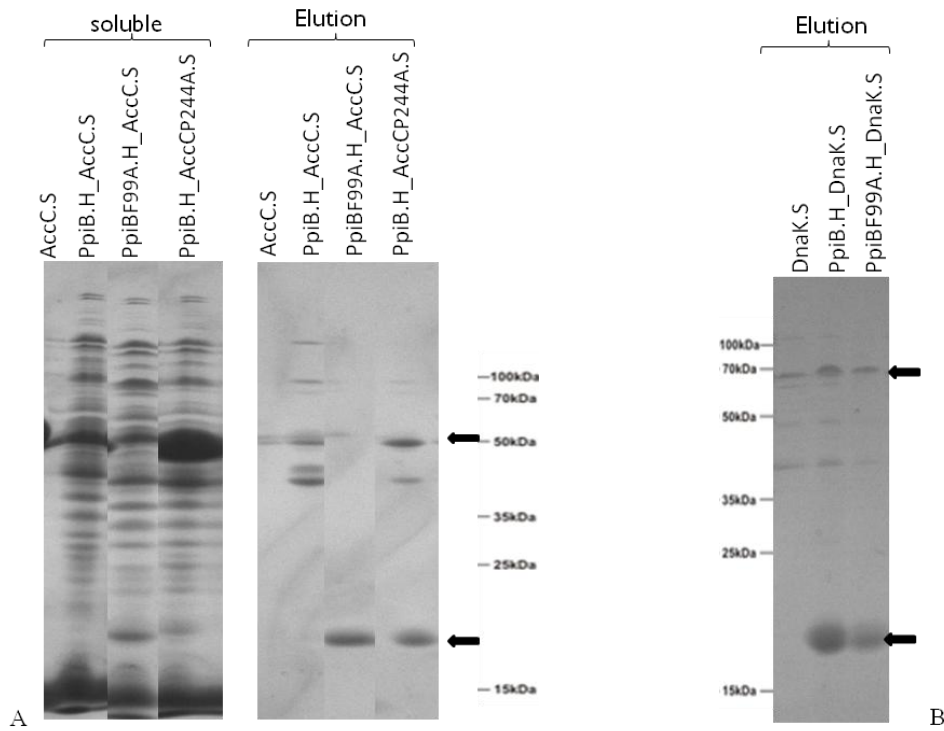


**Εικόνα Γ.2.31.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες DnaK και AccC. Παρουσιάζονται (A) το κλάσμα των ολικών και διαλυτών DnaK<sub>Stag</sub> και AccC<sub>Stag</sub> μετά από αποδιάταξή τους με 8M ουρία και (B) τα κλάσματα συνέκλουσης τους μαζί με την Prib<sub>His</sub>. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη 0, 25 mM IPTG και επώαση στους 30 °C.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση της με τις τέσσερις πρωτεΐνες στόχους, πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Prib<sub>F99A</sub> η οποία φέρει μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με τις τέσσερις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1 (Εικόνα Γ.2.32. και Εικόνα Γ.2.33.).

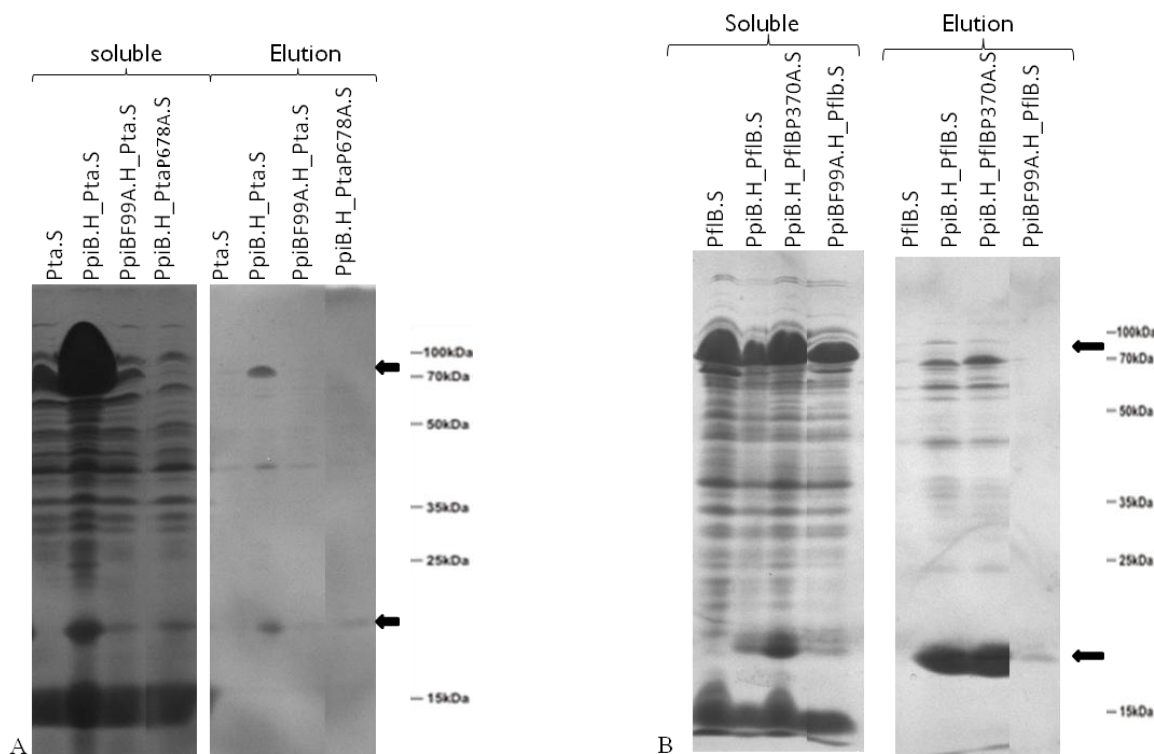
Από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.32.A δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση της Prib<sub>F99A</sub> με την AccC, αφού η δεύτερη παραμένει κυρίως αδιάλυτη, γεγονός που υποδυποδηλώνοντας την αναγκαιότητα της ενεργότητας της Prib για την αλληλεπίδραση και τη διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης της AccC. Αντίθετα, από την Εικόνα Γ.2.32.B παρατηρείται ότι η Prib<sub>F99A</sub> συνεχίζει να αλληλεπιδρά με την DnaK, συμπεραίνοντας ότι στην αλληλεπίδραση της Prib με την DnaK, πιθανώς δε συμμετέχει το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης. Επίσης, από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.33.A δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ της Prib<sub>F99A</sub> με την Pta, αφού η Pta στο κύριο μέρος της παραμένει αδιάλυτη,

υποδηλώνοντας την αναγκαιότητα της ενεργότητας της Prib για την αλληλεπίδραση και τη διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης της Pta. Ακόμα, από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.33.B διαπιστώνεται ότι στην αλληλεπίδραση της Prib με την PflB πιθανώς συμμετέχει το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης αφού δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ της Prib<sub>F99A</sub> με την PflB.



**Εικόνα Γ.2.32.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib: (A) με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες AccC και AccC<sub>P244A</sub> και της Prib<sub>F99A</sub> με την AccC, (B) με την DnaK και της Prib<sub>F99A</sub> με την DnaK. Έκφραση των στελεχών AccC<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-AccC<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-AccC<sub>P244A</sub>Stag, Prib<sub>F99A</sub>His-AccC<sub>Stag</sub>, DnaK<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-DnaK<sub>Stag</sub>, και Prib<sub>F99A</sub>His-DnaK<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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.





**Εικόνα Γ.2.33.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της PribB: (A) με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Pta και Pta<sub>P678A</sub> και της Prib<sub>F99A</sub> με την Pta, (B) με την PflB και PflB<sub>P370A</sub> και της Prib<sub>F99A</sub> με την PflB. Έκφραση των Pta<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-Pta<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-Pta<sub>P678A</sub>Stag, Prib<sub>F99A</sub>His-Pta<sub>Stag</sub> και των PflB<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-PflB<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-PflB<sub>P370A</sub>Stag και Prib<sub>F99A</sub>His-PflB<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης 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.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε εάν στην αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης με τις παραπάνω πρωτεΐνες συμμετέχουν οι προλίνες των πρωτεϊνών αυτών που διατηρούν την *cis* διαμόρφωση. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες AccC<sub>P244A</sub>, Pta<sub>P678A</sub>, PflB<sub>P370A</sub> οι οποίες φέρουν μετάλλαξη όπου αντικαθιστά τις *cis* προλίνες με αλανίνη. Στην πορεία πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της PribB με τις τρεις πιθανές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.32.A διαπιστώνεται ότι πιθανώς η προλίνη P244 της AccC δε συμμετέχει στην αλληλεπίδρασή της με την PribB αφού όπως φαίνεται συνεχίζεται η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης. Στην Εικόνα Γ.2.33.A δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ της Pta<sub>P678A</sub> με την κυκλοφιλίνη, αφού η Pta<sub>P678A</sub> στο κύριο μέρος της παραμένει αδιάλυτη συμπεραίνοντας ότι ενδεχομένως, η προλίνη στη θέση 678 της Pta, είναι αναγκαία για την αλληλεπίδραση της Pta με την PribB και τη σωστή διαμόρφωση της Pta. Επίσης, στην Εικόνα Γ.2.33.B διαπιστώνεται ότι στην αλληλεπίδραση της PribB με την PflB δε συμμετέχει η προλίνη P370 της PflB, αφού συνεχίζει να παρατηρείται αλληλεπίδραση.

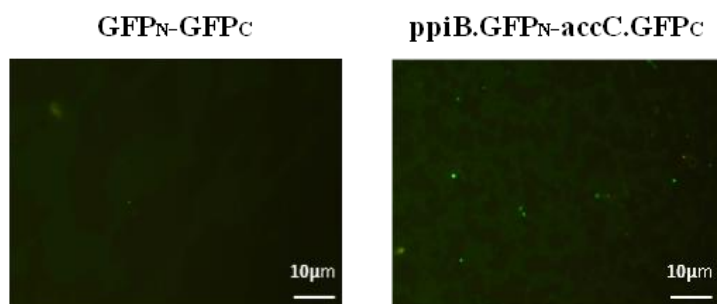
#### Γ.2.6.4.1 Μελέτη της αλληλεπίδρασης της PpiB με την καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (AccC) με τη μέθοδο SPLIT-GFP

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) έχει καταστεί αναπόσπαστο μέρος της μοριακής βιολογίας για μια ποικιλία χρήσεων. Η μέθοδος της split-GFP βασίζεται σε μια πρωτεΐνη GFP, η οποία έχει διαχωριστεί σε δύο πολυπεπτίδια που μαζί συνθέτουν το σύνολο της πρωτεγενούς αλληλουχίας της GFP. Κάθε ένα από τα δύο πολυπεπτίδια, είναι ανίκανο να παράγει φθορισμό. Όταν όμως πραγματοποιείται πρωτεϊνική σύντηξη του κάθε πολυπεπτιδίου με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, τότε τα δύο πολυπεπτίδια έρχονται κοντά και μαζί συνθέτουν ένα λειτουργικό φθοροφόρο, μια λειτουργική GFP.

Το άμινο-πολυπεπτίδιο και το καρβόξυ-πολυπεπτίδιο της GFP πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκαν στο φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1. Στην πορεία, η PpiB κλωνοποιήθηκε στον ίδιο φορέα, στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το άμινο-πολυπεπτίδιο της GFP και AccC κλωνοποιήθηκε στον ίδιο φορέα, στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το καρβόξυ-πολυπεπτίδιο της GFP, ως ένα πολυπεπτίδιο (Magliery et al., 2005).

#### Μικροσκοπική Παρατήρηση των Κυττάρων

Η μικροσκοπική παρατήρηση έγινε σε κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) που εκφράζουν τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν για αλληλεπίδραση και προήλθαν από τριβλία με 0,25mM IPTG επωασμένα O/N στους 30 °C και αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες. Η παρατήρηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω της ανίχνευσης της ακτινοβολίας που παράγεται με μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα Γ.2.34.). Ο φθορισμός που προκύπτει από τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο τα πολυπεπτίδια της GFP πρωτεΐνης υποδηλώνει το φθορισμό που μπορεί να παραχθεί από τη τυχαία αλληλεπίδραση των δύο πολυπεπτιδίων της GFP πρωτεΐνης.



**Εικόνα Γ.2.34.** Μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων με μικροσκόπιο φθορισμού. Απεικονίζονται τα κύτταρα που εκφράζουν μόνο τα πολυπεπτίδια της GFP πρωτεΐνης (ελέγχου) (αριστερά) και της αλληλεπίδρασης της PpiB με την AccC (δεξιά).

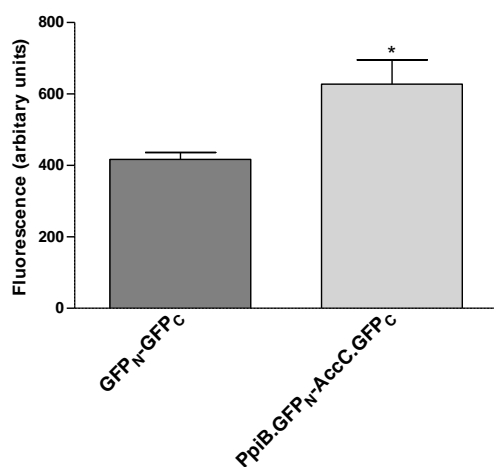
Με αυτήν την μέθοδο, διαπιστώθηκε μια πιθανώς παροδική αλληλεπίδραση της PpiB με την AccC αφού μόνο μερικά κύτταρα έδειξαν ισχυρό φθορισμό σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

#### Μέτρηση με φθορόμετρο της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης με τη μέθοδο της SPLIT-GFP

Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης της PpiB με την AccC πραγματοποιήθηκε σε διαλυτά κλάσματα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3), που

εκφράζουν τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν για αλληλεπίδραση. Τα κύτταρα προήλθαν από τριβλία με 0,25mM IPTG επωασμένα O/N στους 30 °C και αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες. Στην πορεία απομονώθηκαν οι ολικές πρωτεΐνες και στα διαλυτά κλάσματα που προέκυψαν μετρήθηκε η ακτινοβολία που παράγεται με τη χρήση φθορόμετρου (Wilson et al., 2004).

Τέλος, ο φθορισμός που προέκυψε από το διαλυτό κλάσμα κυττάρων που εκφράζουν την Prib με την AccC συγκρίθηκε με αυτόν που προκύπτει από το διαλυτό κλάσμα κυττάρων που εκφράζουν μόνο τα πολυπεπίδια της GFP πρωτεΐνης. Ο φθορισμός που προκύπτει από το διαλυτό κλάσμα κυττάρων που εκφράζουν μόνο τα πολυπεπίδια της GFP πρωτεΐνης υποδηλώνει το φθορισμό που μπορεί να παραχθεί από τη τυχαία αλληλεπίδραση των δύο πολυπεπτιδίων της GFP πρωτεΐνης.



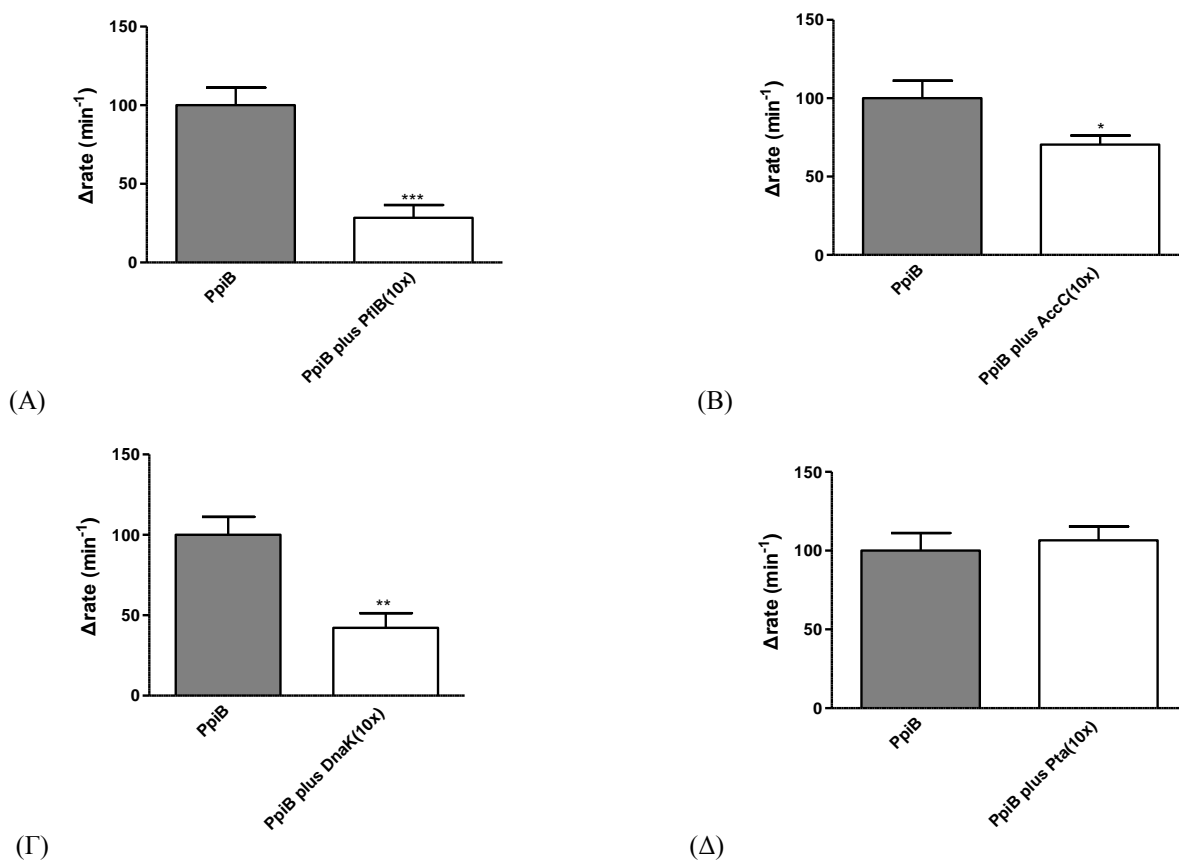
**Εικόνα Γ.2.35.** Μέτρηση του φθορισμού που προκύπτει μετά από την αλληλεπίδραση της Prib με την AccC με τη μέθοδο της SPLIT-GFP. Ο φθορισμός που προέκυψε από την αλληλεπίδραση της Prib με την AccC συγκρίθηκε με το φθορισμό που προέκυψε μόνο από τα πολυπεπίδια της GFP πρωτεΐνης (GFP<sub>N</sub>-GFP<sub>C</sub>). Ο αστερίσκος υποδηλώνει τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) μέσω του Unpaired t test (P<0,05).

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα Γ.2.35, η ποσοτικοποίηση του φθορισμού που προέκυψε από το διαλυτό κλάσμα κυττάρων που εκφράζουν την Prib με την AccC είναι υψηλότερος από αυτόν που προκύπτει από το διαλυτό κλάσμα κυττάρων που εκφράζουν μόνο τα πολυπεπίδια της GFP πρωτεΐνης, επιβεβαιώνοντας μια πιθανώς παροδική αλληλεπίδραση της Prib με την AccC.

#### **Γ.2.6.5 Στην πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων της Prib με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, εμπλέκεται το ενεργό κέντρο PPIάσης της**

Για να διερευνηθεί περαιτέρω το ενδεχόμενο το ενεργό κέντρο PPIάσης της Prib να εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις της με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους που έχουν αναφερθεί, προσδιορίστηκε πόσο ανασταλτικά επιδρούν αυτές στην ενεργότητα PPIάσης της κυκλοφιλίνης. Εάν μια πρωτεΐνη στόχος αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης τότε πιθανώς να ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης

στο ενεργό κέντρο με το συνθετικό υπόστρωμα της αντίδρασης οπότε να μειώνεται η μετρούμενη ενζυμική ενεργότητα ΡΡΪάσης της κυκλοφιλίνης.

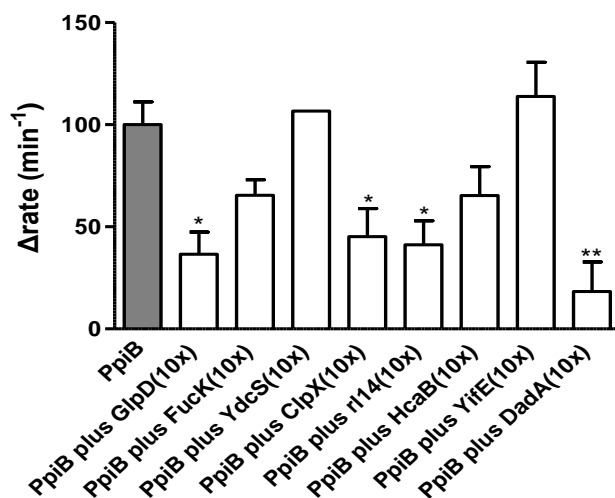


**Εικόνα Γ.2.36.** Η επίδραση των πιθανών πρωτεϊνών στόχων στην ενεργότητα ΡΡΪάσης της PpiB (0.14 μM): (Α) η επίδραση της PflB (1.4μM), (Β) Η επίδραση της AccC (1.4μM), (Γ) η επίδραση της DnaK (1.4μM) (Δ) η επίδραση της Pta(1.4μM). Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

Στην Εικόνα Γ.2.36., παρατηρείται ότι η προσθήκη όλων των πρωτεϊνών στόχων εκτός από την Pta σε συγκέντρωση 10x μεγαλύτερη από αυτήν της κυκλοφιλίνης, προκαλούν μείωση της ενεργότητας ΡΡΪάσης της PpiB. Το γεγονός αυτό ίσως υποδεικνύει έναν πιθανό ανταγωνισμό των πιθανών πρωτεϊνών στόχων με το υπόστρωμα της αντίδρασης για δέσμευσή τους στο ενεργό κέντρο ΡΡΪάσης της PpiB. Η Pta δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση στην ενεργότητα ΡΡΪάσης της PpiB, πιθανώς γιατί αλληλεπιδρά με άλλη περιοχή της κυκλοφιλίνης.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν κάποια από τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους της PpiB με τις οποίες δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση, όπως είναι οι GlpD, FucK, YdcS, ClpX, R114, HcaB, YifE και DadA, είναι ικανές να προκαλέσουν μείωση της ενεργότητας ΡΡΪάσης της PpiB. Από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.37., συμπεραίνεται ότι με εξαίρεση τις FucK, YdcS, HcaB και YifE, οι υπόλοιπες πρωτεΐνες μειώνουν την ενεργότητα ΡΡΪάσης της PpiB, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς ανταγωνίζονται με το

υπόστρωμα της αντίδρασης για δεσμευσή τους στο ενεργό κέντρο ΡΡΐάσης της κυκλοφιλίνης και ενεργώντας τελικά ως πρωτεΐνες στόχοι της.

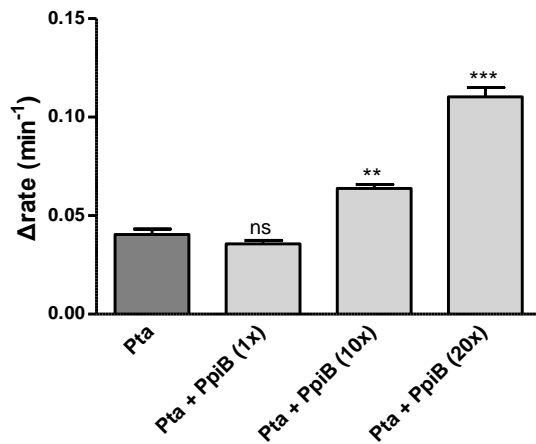


**Εικόνα Γ.2.37.** Η επίδραση των πιθανών πρωτεϊνών στόχων (1.4μΜ) στην ενεργότητα ΡΡΐάσης της ΡριΒ (0.14 μΜ). Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

#### Γ.2.6.6 Η ΡριΒ προκαλεί αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας ορισμένων πρωτεϊνών στόχων της

Θεωρώντας ότι η ΡριΒ αλληλεπιδρά με τις τρεις από τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, στη συνέχεια ερευνήθηκε η λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής εξετάζοντας το ενδεχόμενο η αλληλεπίδραση με τη κυκλοφιλίνη να προκαλεί κάποια αλλαγή της ενζυμικής τους ενεργότητας.

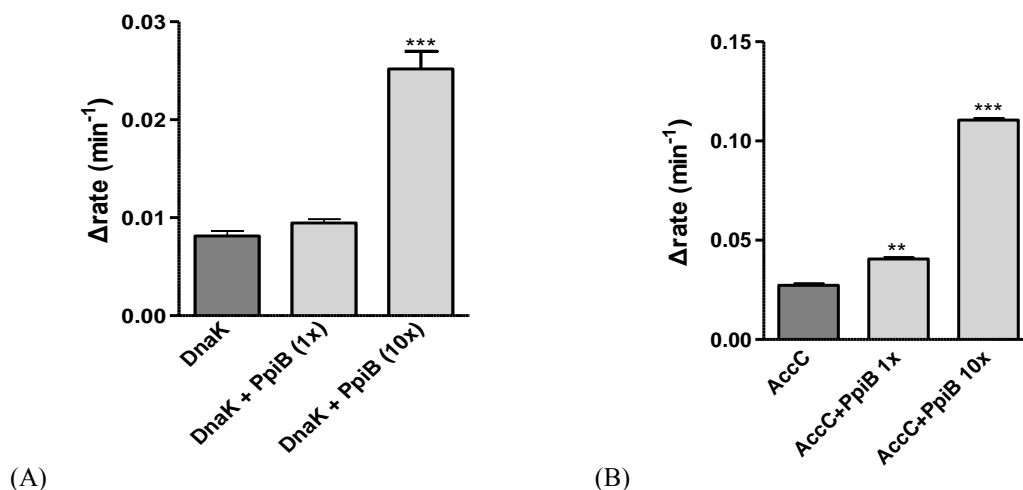
Αρχικά, για να εξεταστεί η λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ της κυκλοφιλίνης ΡριΒ και της Ρτα, προσδιορίστηκε η ενεργότητα φωσφορικής ακετυλομεταφοράς της Ρτα στην κατεύθυνση δημιουργίας του ακετυλο-CoA της αντίδρασης:  $\text{ακέτυλο-P} + \text{CoA} \leftrightarrow \text{ακέτυλο-CoA} + \text{P}_i$ , παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ΡριΒ.



**Εικόνα Γ.2.38.** Μέτρηση της ενεργότητας φωσφορικής ακετυλομεταφοράσης της Pta στην κατεύθυνση δημιουργίας του ακετυλο-CoA της αντίδρασης, απουσία και παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων PpiB. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) μέσω του Unpaired t test ( $P < 0.05$ ).

Στην Εικόνα Γ.2.38., παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση της ενεργότητας φωσφορικής ακετυλομεταφοράσης της Pta, παρουσία της PpiB. Η αύξηση αυτή είναι ανάλογη, της αυξανόμενης συγκέντρωσης της κυκλοφιλίνης. Ενώ, σε γραμμομοριακή συγκέντρωση της PpiB 20 φορές μεγαλύτερη από της Pta, η αύξηση της ενεργότητας της Pta είναι κατά 273% μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη αντίδραση παρουσία μόνο της Pta.

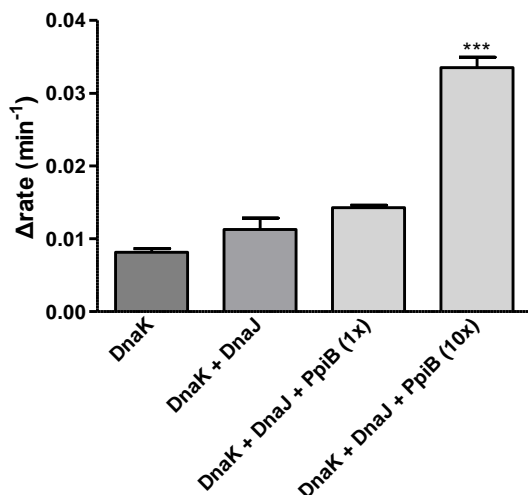
Η DnaK όπως όλες οι Hsp70 πρωτεΐνες, έχει ασθενή ενεργότητα ATPάσης η οποία λειτουργικά σχετίζεται με τους κύκλους σύνδεσης και απελευθέρωσης του πεπτιδίου, που χαρακτηρίζουν τη δραστηριότητα της ως συνοδό πρωτεΐνη (τσαπερόνη)(Liberek et al., 1991). Επιπλέον, η καρβοξυλίωση της βιοτίνης από την καρβοξυλάση της βιοτίνης (AccC) απαιτεί την υδρόλυση του ATP. Όταν απουσιάζει η βιοτίνη, η καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση του ATP με έναν πολύ πιο αργό ρυθμό (Climent και Rudio, 1986). Προκειμένου να διερευνηθεί η λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης της PpiB με τις DnaK και AccC, μετρήθηκε η ικανότητα υδρόλυσης του ATP της DnaK και AccC, απουσία και παρουσία της PpiB.



**Εικόνα Γ.2.39.** Μέτρηση της ικανότητας υδρόλυσης του ATP της DnaK (A) και AccC (B) παρουσία και απουσία της PpiB. Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια και βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Τόσο στην περίπτωση της DnaK (Εικόνα Γ.2.39.A) όσο και στην περίπτωση της AccC (Εικόνα Γ.2.39.B), παρατηρήθηκε αύξηση της ικανότητας υδρόλυσης του ATP, η οποία εξαρτάται από την αύξηση συγκέντρωσης της PpiB. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας ΑΤΡάσης, έως και σε ποσοστό 315% μεγαλύτερη ενεργότητα ΑΤΡάσης από την αντίδραση ελέγχου, όταν προστέθηκε 10x γραμμομοριακή περίσσεια κυκλοφιλίνης έναντι της DnaK και περίπου 420% μεγαλύτερη ενεργότητα ΑΤΡάσης από την αντίδραση ελέγχου όταν προστέθηκε 10x γραμμομοριακή περίσσεια PpiB έναντι της AccC.

Επιπλέον, βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι η εγγενώς χαμηλή ενεργότητα ΑΤΡάσης της DnaK, αυξάνεται από πρωτεΐνες που δρουν ως υποστρώματά της, σε συνεργία με τον j-τομέα συν-συνοδών πρωτεϊνών (co-chaperones proteins) (Karzai and McMacken, 1996, Laufel et al., 1999). Έτσι στη συνέχεια, μετρήθηκε εκ νέου η ενεργότητα ΑΤΡάσης της DnaK παρουσία και απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων κυκλοφιλίνης, όμως αυτήν τη φορά στις αντιδράσεις συμπεριλήφθηκε και ισομοριακή ποσότητα της πρωτεΐνης DnaJ (DnaK co-chaperone) (Εικόνα Γ.2.40.).



**Εικόνα Γ.2.40.** Μέτρηση της ικανότητας υδρόλυσης του ATP της DnaK, απουσία και παρουσία της DnaJ και αυξανόμενων συγκεντρώσεων της PpiB. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Στην Εικόνα Γ.2.40., παρατηρείται ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της ενεργότητας ATPάσης της DnaK παρουσία συγκεντρώσεων της PpiB, περίπου 411% μεγαλύτερη ενεργότητα ATPάσης από την αντίδραση ελέγχου, όταν προστέθηκε 10x γραμμομοριακή περίσσεια κυκλοφιλίνης έναντι της DnaK και της DnaJ. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι πιθανώς η PpiB μπορεί να δράσει ως υπόστρωμα της DnaK.

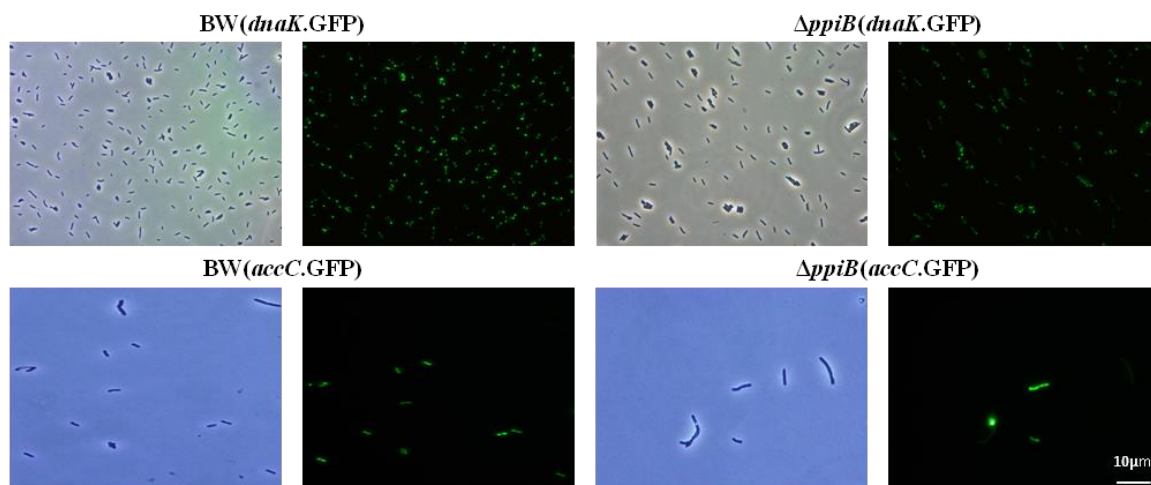
### Γ.2.6.7 Ο ρόλος της PpiB στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση της DnaK, AccC και της Pta

Στην προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού δράσης της PpiB στην ενίσχυση της ενζυμικής ενεργότητας της DnaK, της AccC και της Pta, εξετάστηκε ο ρόλος της κυκλοφιλίνης στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των παραπάνω πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα στελέχη που υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές παρουσία και απουσία της PpiB.

Συγκεκριμένα, τα στελέχη BW25113 και  $\Delta ppiB$  μετασηματίστηκαν εκ νέου με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης που φέρουν επίτοπο της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης *dnaK*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N, *accC*<sub>His</sub>-GFP.pCA24N και *pta*<sub>His</sub>-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. Στην Εικόνα Γ.2.41. απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των παρακάτω στελεχών: BW25113(*dnaK*.GFP),  $\Delta ppiB$ (*dnaK*.GFP), BW25113(*accC*.GFP) και  $\Delta ppiB$ (*accC*.GFP).



## 0.1mM IPTG

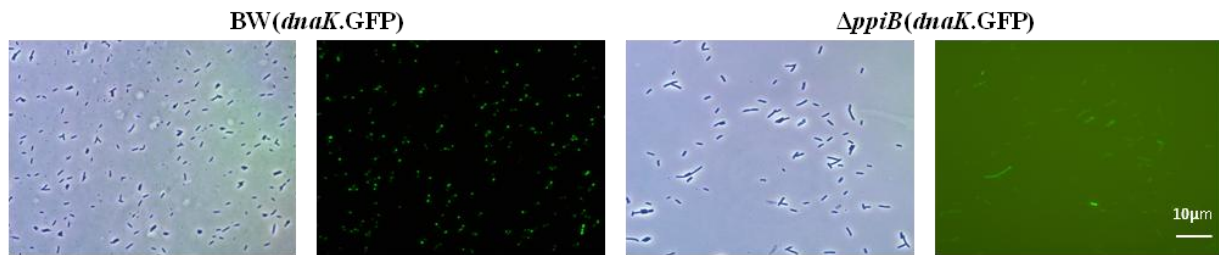


**Εικόνα Γ.2.41.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*dnaK.GFP*),  $\Delta$ *ppiB(dnaK.GFP)*, BW25113(*accC.GFP*) και  $\Delta$ *ppiB(accC.GFP)* κατά την εκθετική φάση αύξησης στους 30 °C, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Από την κυτταρική μορφολογία του στελέχους BW25113(*dnaK.GFP*) παρατηρείται ότι η DnaK εντοπίζεται κυρίως στον ένα πόλο και σπανιότερα στους δύο πόλους ή στο κέντρο των κυττάρων (Εικόνα Γ.2.41.). Αντίθετα, στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiB(dnaK.GFP)* παρατηρείται ότι τα κύτταρα που παρουσιάζουν πολικό εντοπισμό της DnaK είναι πολύ λιγότερα. Τα περισσότερα παρουσιάζουν την DnaK να εντοπίζεται σε διασκορπισμένα σημεία κατά μήκος του κυττάρου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρουσία της PpiB απαιτείται για τη σωστή ενδοκυτταρική τοποθέτηση της DnaK. Επίσης, στην Εικόνα Γ.2.41. παρατηρείται ότι στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiB(accC.GFP)*, η πλειοψηφία των κυττάρων εμφανίζει μεγάλα έγκλειστα σωμάτια υποδεικνύοντας συσσωμάτωση λόγω λάθος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η AccC εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα έγκλειστα σωμάτια απουσιάζουν, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κυκλοφιλίνη λειτουργεί προστατευτικά, βοηθώντας στην ορθή αναδίπλωση της AccC.

Στο *E.coli*, έχει δειχθεί ότι η DnaK εντοπίζεται εκ νέου σε εστίες στους 42°C και άνω, προφανώς ακολουθώντας τον εντοπισμό των αναδυόμενων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Kumar and Sourjik, 2012, Winker et al., 2010). Έτσι, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα αφού πρώτα τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε ένα θερμικό σοκ για 20 λεπτά, στους 42 °C.

## 0.1mM IPTG



**Εικόνα Γ.2.42.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*dnaK.GFP*) και  $\Delta$ *ppiB(dnaK.GFP)* κατά την εκθετική φάση αύξησης στους 30°C, μετά από θερμικό σοκ για 20 λεπτά στους 42 °C, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.42. παρατηρείται ένα ανάλογο πρότυπο εντοπισμού της DnaK, αντίστοιχα σε κάθε στέλεχος, γεγονός που υποστηρίζει περαιτέρω την προηγούμενη διαπίστωση.

Στην περίπτωση της *Pta* δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν ανάλογα αποτελέσματα, αφού το σήμα φθορισμού της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης ήταν περιορισμένο τόσο στο στέλεχος BW25113(*pta.GFP*) όσο και στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiB(pta.GFP)*.

### Γ.2.7 Ο ρόλος της PpiB στην κυτταρική διαίρεση στο *E.coli*

Όπως παρατηρήθηκε η απουσία της PpiB προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης όπως και η υπερέκφραση του γονιδίου *ppiB* δημιουργεί επιμηκυσμένα κύτταρα, τόσο όταν υπερεκφράζεται στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiB* όσο και όταν υπερεκφράζεται στο στέλεχος BW25113. Αντίθετα όταν υπερεκφράζονται τα μεταλλαγμένα γονίδια *ppiB<sub>F99A</sub>* *ppiB<sub>R43A</sub>* τα κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία, παρόμοια με την αντίστοιχη του στελέχους αγρίου τύπου, συμπεραίνοντας ότι η κυτταρική επιμήκυνση που παρατηρήθηκε οφείλεται στα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης PpiB και ειδικότερα είναι πιθανό να οφείλεται στην ενεργότητα PPIάσης της, αφού η παρουσία των πρωτεϊνών PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> παρουσιάζει την ίδια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Επειδή η διαγραφή ή η υπερέκφραση της PpiB οδηγεί σε διάφορους βαθμούς αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης εξετάστηκε εάν η PpiB πιθανώς ενεργοποιεί αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης ή αδρανοποιεί προαγωγείς της κυτταρικής διαίρεσης ή ακόμα και ρυθμίζει τη λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση. Για αυτόν το σκοπό εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση στο βακτήριο *Escherichia coli* και από τις κρυσταλλικές δομές τους, εντοπίστηκαν ποιες από αυτές διαθέτουν *cis* προλίνες (Πίνακας Γ.2.7.). Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη προλινών που διατηρούν την *cis* διαμόρφωση σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες υποδεικνύει την πιθανή ρύθμιση της λειτουργίας του ενζύμου μέσω *cis/trans* ισομερισμού (Schmidpeter et al., 2015, Schmid 1993), έτσι ώστε η απαίτηση μιας PPIάσης μπορεί να είναι αναγκαία.

**Πίνακας Γ.2.7.** Πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης PpiB που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση.

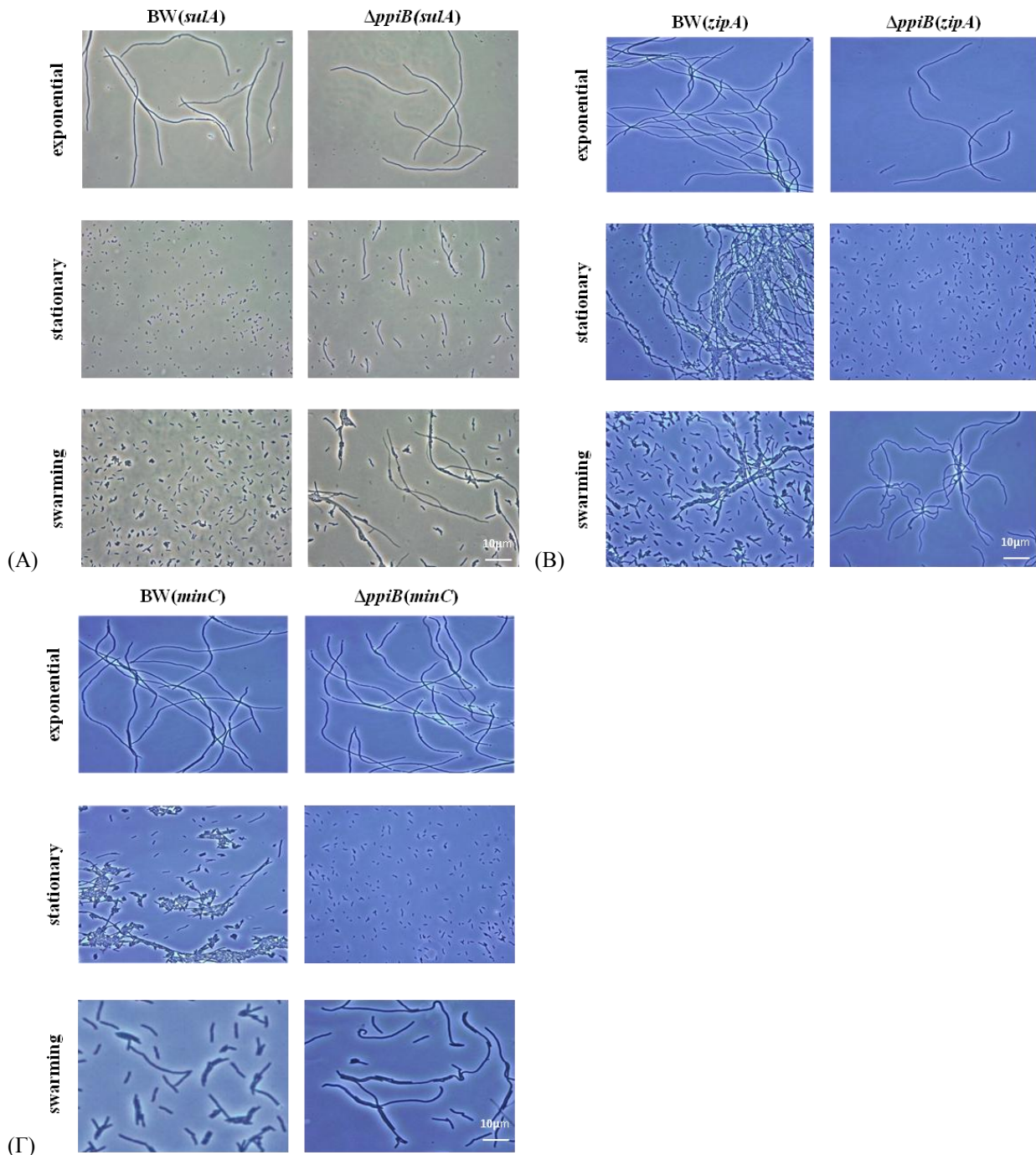
– : εντοπίζονται *cis* προλίνες στις κρυσταλλογραφικές δομές ομόλογων πρωτεϊνών του *E.coli*

\* : δεν εντοπίζονται *cis* προλίνες

Πρωτεΐνες Κυτταρικής Διαίρεσης	Όνομα Πρωτεΐνης	M.B.	Cis προλίνες
<b>SulA</b> (b0958/JW0941)	αναστολέας της κυτταρικής διαίρεσης	18.54 kD	-
<b>FtsZ</b> (b0095/JW0093)	GTP-δεσμευόμενη πρωτεΐνη κυτταρικής διαίρεσης	40.32kD	*
<b>ZipA</b> (b2412/JW2404)	σταθεροποιητής Ftsz	36.47kD	P67, P89
<b>FtsQ</b> (b0093/JW0091)	πρωτεΐνη που ανήκει στη συνδεσμολογία του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου υπεύθυνου για τη συναρμολόγηση του διαφραγματικού δακτυλίου	31.43kD	P116
<b>MinC</b> (b1176/JW1165)	πρωτεΐνη που προσδιορίζει τη θέση του διαφραγματικού δακτυλίου	24.77kD	-
<b>FtsK</b> (b0890/JW0873)	πρωτεΐνη του διαφράγματος που απαιτείται για το χρωμοσωμικό διαχωρισμό	146.64kD	P985, P1108, P524

### Γ.2.7.1 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και *ΔppiB* όταν υπερεκφράζονται σε αυτά οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση

Διερευνήθηκε εάν η λειτουργία των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση ρυθμίζεται από την κυκλοφιλίνη PpiB. Αρχικά, ελέγχθηκε εάν αλλάζει η κυτταρική μορφολογία όταν υπερεκφράζονται, στα στελέχη BW25113 και *ΔppiB*, απουσία και παρουσία δηλαδή της PpiB. Για αυτόν το σκοπό τα στελέχη BW25113 και *ΔppiB* μετασηματίστηκαν με τους ανασυνδυασμένους φορείς *ftsZ*<sub>His-GFP</sub>.pCA24N, *zipA*<sub>His-GFP</sub>.pCA24N, *minC*<sub>His-GFP</sub>.pCA24N, *ftsK*<sub>His-GFP</sub>.pCA24N, *sulA*<sub>His-GFP</sub>.pCA24N και *ftsQ*<sub>His-GFP</sub>.pCA24N. Η υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης, έγινε παρουσία IPTG συγκέντρωσης 0.1 mM. Η αύξηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB και σε τριβλία *swarming*, σε θερμοκρασία 30 °C και η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών διεξήχθη κατά την εκθετική και τη στατική φάση ανάπτυξης, όπως και κατά την ομαδική κίνηση, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης. Όλα τα pCA24N-GFP πλασμίδια με διάφορα κλωνοποιημένα γονίδια ελήφθησαν από τη βιβλιοθήκη ASKA του NARA Institute (Kitagawa et al., 2005).



**Εικόνα Γ.2.43.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών (A) BW25113(*sulA*), ΔppiB(*sulA*) , (B) BW25113(*zipA*), ΔppiB(*zipA*), (Γ) BW25113(*minC*), ΔppiB(*minC*) κατά την εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης και κατά την ομαδική κίνηση, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Από την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*sulA*) και ΔppiB(*sulA*) (Εικόνα Γ.2.43.A), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της *SulA* κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων λόγω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης (Huisman et al., 1984). Όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη στατική φάση ανάπτυξης παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων του στελέχους BW25113(*sulA*) έχει διαιρεθεί φυσιολογικά, ενώ τα κύτταρα του στελέχους ΔppiB(*sulA*) παραμένουν επιμηκυσμένα. Το ίδιο παρατηρείται όταν τα κύτταρα των αντίστοιχων στελεχών

παρατηρούνται κατά την ομαδική κίνηση, όπου το στέλεχος *ΔρριB(sulA)* προκαλεί πιο επιμηκυσμένα κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν, ότι η απουσία της PpiB επεκτείνει περαιτέρω την καθυστερημένη κυτταρική διαίρεση λόγω της υπερέκφρασης της SulA, όπως επίσης ότι η παρουσία της PpiB υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης και σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία της SulA.

Ακόμα, από την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*zipA*) και *ΔρριB(zipA)* (Εικόνα Γ.2.43.Β), παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της ZipA κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, λόγω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης, προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων. Αν και η ήπια έκφραση της ZipA είναι γνωστό ότι δεν παρεμβαίνει στην κυτταρική διαίρεση (Hale et al., 1997), η υπερέκφραση προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα αναστέλλοντας τη διαίρεση (Cabré et al., 2013). Όταν τα κύτταρα εισέρχονται στη στατική φάση ανάπτυξης παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων του στελέχους *ΔρριB(zipA)* έχει διαιρεθεί φυσιολογικά, ενώ τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου παραμένουν τα περισσότερα επιμηκυσμένα. Το αντίθετο παρατηρείται όταν τα κύτταρα των αντίστοιχων στελεχών παρατηρούνται κατά την ομαδική κίνηση, όπου το στέλεχος *ΔρριB(zipA)* προκαλεί περισσότερα επιμηκυσμένα κύτταρα από ότι το στέλεχος BW25113(*zipA*), όπου τα κύτταρα εμφανίζονται επιμηκυσμένα σε μικρότερη συχνότητα. Γεγονός που υποδεικνύει ότι η παρουσία της PpiB υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης και σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία της ZipA.

Επίσης, από την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*minC*) και *ΔρριB(minC)* (Εικόνα Γ.2.43.Γ) παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της MinC κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων λόγω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης αφού αλληλεπιδρά άμεσα και αποπολυμερίζει τα πολυμερή της FtsZ (Shen and Lutkenhaus, 2009). Όταν τα κύτταρα παρατηρούνται κατά τη ομαδική κίνηση, το στέλεχος *ΔρριB(minC)* προκαλεί πιο επιμηκυσμένα κύτταρα σε σχέση με το στέλεχος BW25113(*minC*). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν, ότι η παρουσία της PpiB σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία της MinC.

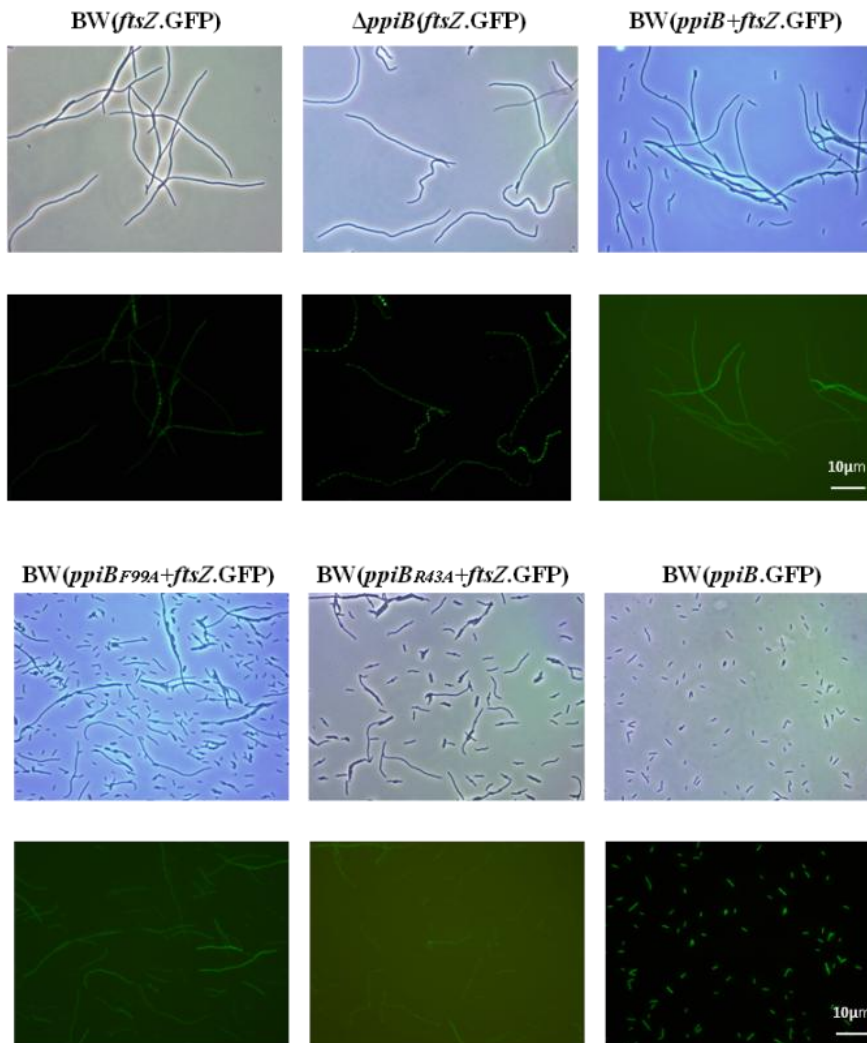
Τέλος, όταν υπερεκφράζονται οι FtsK και FtsQ τόσο στο στέλεχος αγρίου τύπου όσο και στο στέλεχος *ΔρριB* δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στην κυτταρική μορφολογία τους, υποδηλώνοντας ότι ίσως η PpiB δε εμπλέκεται στη ρύθμιση κάποιας από αυτές, στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την ιδέα ότι η PpiB σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης ή σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της κυτταρικής διαίρεσης ρυθμίζοντας κάποιες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτήν.

### Γ.2.7.2 Ο ρόλος της PpiB στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνηθεί περισσότερο ο μηχανισμός δράσης της PpiB στη ρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση, εξετάστηκε η ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση, ώστε να ανιχνευθεί η όποια μεταβολή στην τοποθέτησή τους απουσία ή παρουσία της PpiB. Για αυτόν το σκοπό, παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα στελέχη που υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές παρουσία και απουσία της PpiB αλλά και των PpiB<sub>F99A</sub>, PpiB<sub>R43A</sub>.



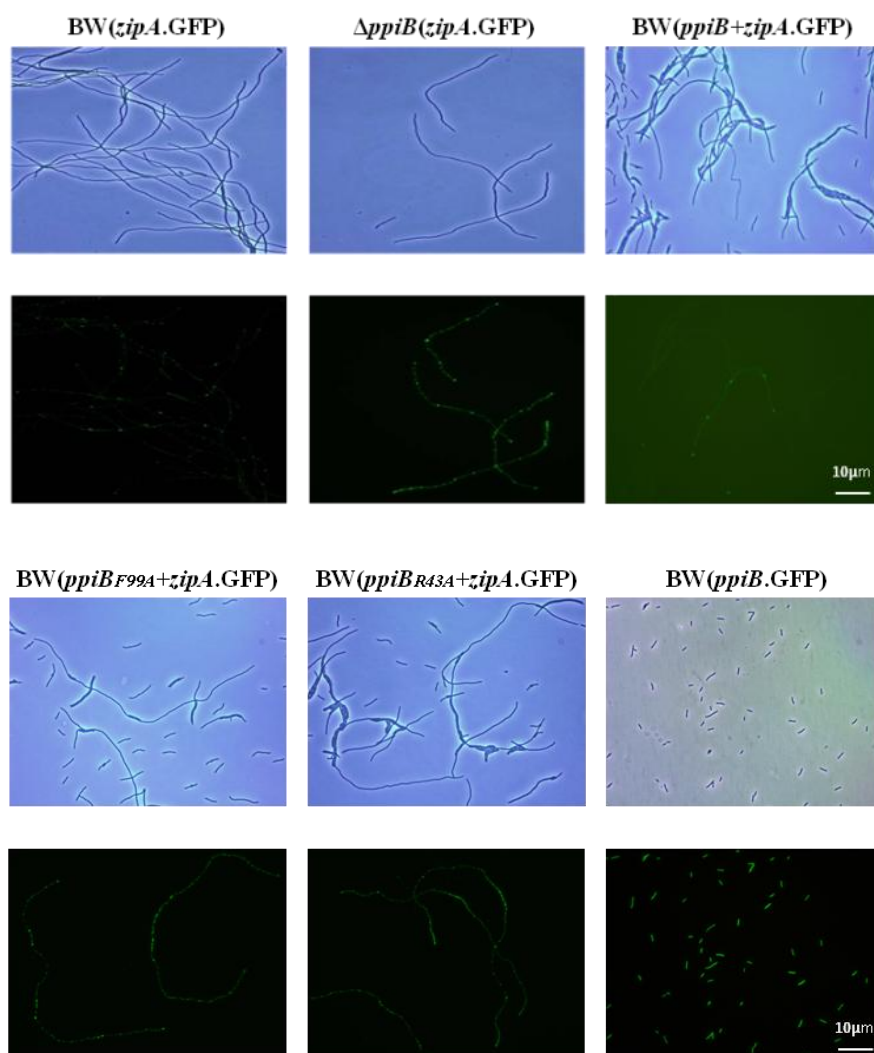
Τα στελέχη BW25113,  $\Delta ppiB$ , BW25113(*ppiB*.Hta), BW25113(*ppiB*<sub>F99A</sub>.Hta) και BW25113(*ppiB*<sub>R43A</sub>.Hta) μετασχηματίστηκαν με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης που φέρουν επίτοπο της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης *ftsZ*<sub>His<sup>-</sup>GFP</sub>.pCA24N, *zipA*<sub>His<sup>-</sup>GFP</sub>.pCA24N, *minC*<sub>His<sup>-</sup>GFP</sub>.pCA24N, *ftsK*<sub>His<sup>-</sup>GFP</sub>.pCA24N, *sulA*<sub>His<sup>-</sup>GFP</sub>.pCA24N και *ftsQ*<sub>His<sup>-</sup>GFP</sub>.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 ανάπτυξης.



**Εικόνα Γ.2.44.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*ftsZ*.GFP),  $\Delta ppiB$ (*ftsZ*.GFP), BW25113(*ppiB*+*ftsZ*.GFP), BW25113(*ppiB*<sub>F99A</sub>+*ftsZ*.GFP), BW25113(*ppiB*<sub>R43A</sub>+*ftsZ*.GFP) και BW25113(*ppiB*.GFP), κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης στους 30 °C, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

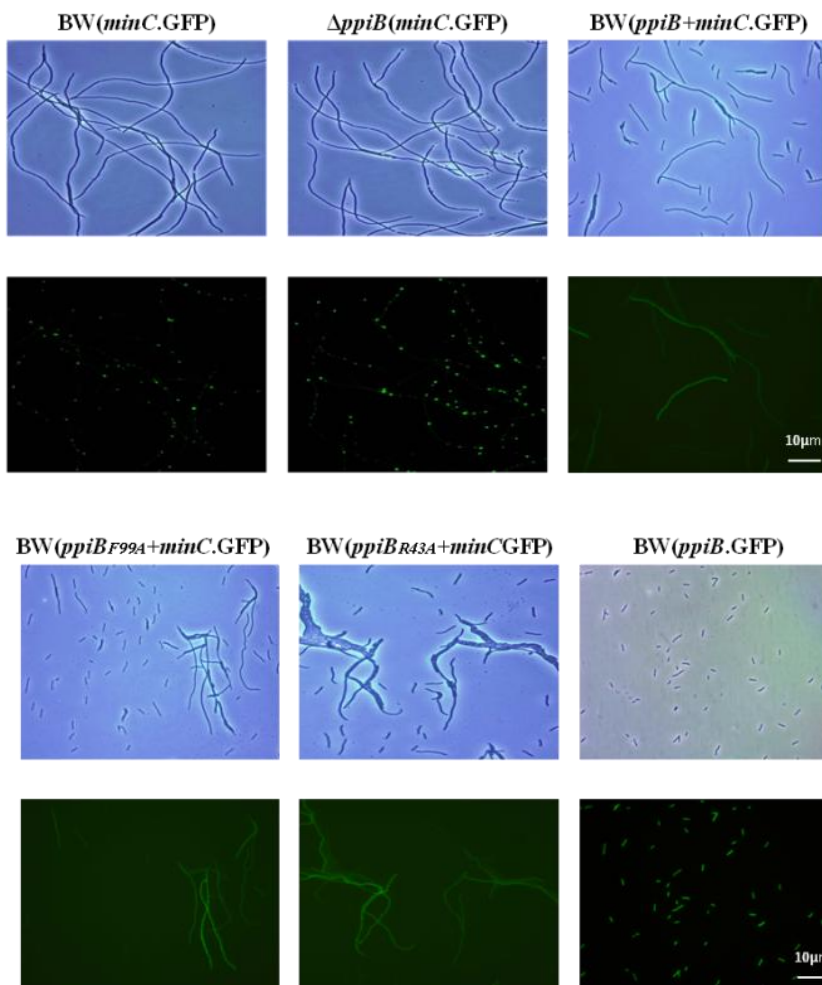
Αρχικά, από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.44., παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της FtsZ στο στέλεχος αγρίου τύπου προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και σχηματισμό επιμηκυμένων κυττάρων. Επίσης, παρατηρείται η τυπική ενδοκυτταρική της τοποθέτηση στα διαφράγματα με τη μορφή δακτυλίου αλλά και κάποια κύτταρα που εμφανίζουν μια εκτεταμένη ελικοειδή μορφή καθ'όλο το μήκος

τους (Sun and Margolin, 1998; Ben-Yehuda and Richard Losick, 2002; Thanedar and Margolin, 2004). Η ίδια κυτταρική μορφολογία απαντάται και όταν η FtsZ υπερεκφράζεται στο στέλεχος  $\Delta ppiB$ . Ωστόσο, όταν υπερεκφράζεται και η PpiB στα κύτταρα, στο στέλεχος BW(*ppiB*+*ftsZ.GFP*), αυτά παραμένουν επιμηκυσμένα, όμως δεν παρατηρείται η ενδοκυτταρική τοποθέτηση της FtsZ στα διαφράγματα με τη μορφή δακτυλίου, αντ' αυτού ο φθορισμός εντοπίζεται διάχυτος σε όλο το κυτταρόπλασμα. Επίσης, όταν η FtsZ υπερεκφράζεται στα στελέχη που υπερεκφράζονται και οι PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub>, τότε τα κύτταρα μικραίνουν σε μήκος, αν και παραμένουν αρκετά επιμηκυσμένα, και επαναφέρεται η ορθή ενδοκυτταρική τοποθέτηση της FtsZ σε Z-δακτυλίου. Συμπερασματικά, η FtsZ παρουσία της PpiB φαίνεται ότι δε μπορεί να σχηματίσει δακτύλιους εντοπισμένους σε πιθανές θέσεις διαίρεσης, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στο ανασταλτικό αποτέλεσμα της κυκλοφλίνης στη συγκρότηση ενός λειτουργικού Z-δακτυλίου. Η ενεργότητα PPIάσης της PpiB φαίνεται να είναι απαραίτητη για αυτήν την ανασταλτική της δράση στη συγκρότηση ενός λειτουργικού Z-δακτυλίου. Για να κατανοηθεί καλύτερα η λειτουργία της PpiB στη παρεμπόδιση του ορθού εντοπισμού του Z-δακτυλίου μελετήθηκε επίσης ο εντοπισμός της ίδιας της PpiB. Για αυτόν το σκοπό υπερεκφράστηκε η PpiB.GFP σε κύτταρα αγρίου τύπου και όπως παρατηρείται από την Εικόνα Γ.2.44. εντοπίζεται σε όλο το κυτταρόπλασμα και όχι μόνο σε πιθανά σημεία διαίρεσης.



**Εικόνα Γ.2.45.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*zipA.GFP*),  $\Delta$ *priB*(*zipA.GFP*), BW25113(*priB*+*zipA.GFP*), BW25113(*priB*<sub>F99A</sub>+*zipA.GFP*), BW25113(*priB*<sub>R43A</sub>+*zipA.GFP*) και BW25113(*priB.GFP*), κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης στους 30 °C, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Όπως αναφέρθηκε η υπερέκφραση της ZipA αναστέλει την κυτταρική διαίρεση προκαλώντας σχηματισμό επιμηκυμένων κυττάρων και τοποθετείται ενδοκυτταρικά στη μεμβράνη σε πιθανές θέσεις σχηματισμού του Z-δακτυλίου (Mileykovskaya et al., 1998; Hale and Boer, 1997; Hale and Boer, 1999). Η κυτταρική μορφολογία του στελέχους BW25113(*zipA.GFP*) και του στελέχους  $\Delta$ *priB*(*zipA.GFP*) χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη επιμήκυνση των κυττάρων και υποδεικνύει ένα πρότυπο εντοπισμού της ZipA σε διάσπαρτα σημεία κατά μήκος της περιφέρειας των κυττάρων, καθώς και στους κυτταρικούς πόλους. Αντίθετα, όταν υπερεκφράζεται και η P*riB* στα κύτταρα, στο στέλεχος BW(*priB*+*zipA.GFP*), αυτά παραμένουν κυρίως επιμηκυμένα, όμως φαίνεται ότι εμποδίζεται η συσσώρευση της ZipA σε αυτές τις περιοχές στην πλειονότητα των κυττάρων. Αντ'αυτού παρατηρείται μια αμυδρή, διάχυτη κυτταροπλασματική τοποθέτησή της κατά μήκος των κυττάρων. Η ίδια εικόνα εντοπισμού παρατηρείται και όταν η ZipA υπερεκφράζεται στα στελέχη που υπερεκφράζονται και οι P*riB*<sub>F99A</sub> και P*riB*<sub>R43A</sub>. Συνάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι η P*riB* επιδρά αρνητικά στη λειτουργία της ZipA και η ενεργότητα P*RI*άσης της δεν είναι απαραίτητη για αυτήν την αρνητική επίδραση.





**Εικόνα Γ.2.46.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*minC.GFP*),  $\Delta$ *ppiB(minC.GFP)*, BW25113(*ppiB+minC.GFP*), BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>+minC.GFP*), BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>+minC.GFP*) και BW25113(*ppiB.GFP*), κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης στους 30 °C, με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης και με μικροσκοπία φθορισμού, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

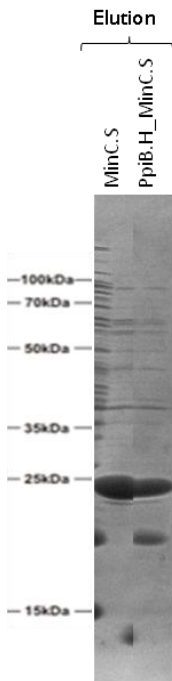
Επίσης, από την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*minC.GFP*) και  $\Delta$ *ppiB(minC.GFP)*, παρατηρείται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MinC αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας επιμηκυσμένα κύτταρα, που φέρουν μεγάλα έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies) υποδεικνύοντας συσσωμάτωση λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών (Εικόνα Γ.2.46.). Ενδοκυτταρικά δε μπορέσαμε να παρατηρήσουμε τοποθετησή της στους πόλους σε κανένα από τα δύο στελέχη. Σε αντίθεση, όταν υπερεκφράζεται και η PpiB στα κύτταρα, στο στέλεχος BW(*ppiB+minC.GFP*), τα μεγάλα έγκλειστα σωμάτια απουσιάζουν εντελώς, το μέγεθος των κυττάρων μικραίνει και η MinC εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Η ίδια κυτταρική μορφολογία συναντάται και όταν η MinC υπερεκφράζεται στα στελέχη που υπερεκφράζονται και οι PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub>. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η PpiB λειτουργεί προστατευτικά, βοηθώντας στην ορθή αναδίπλωση της MinC. Προστατευτικά, λειτουργούν και οι PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub>, που έχουν μειωμένη ενεργότητα PPIάσης, όμως η ικανότητα τσαπερόνης τους δεν έχει μειωθεί τελείως. Συμπερασματικά, σε αυτόν τον προστατευτικό μηχανισμό της κυκλοφιλίνης προς την MinC, πιθανώς δεν εμπλέκεται η ενεργότητα PPIάσης της κυκλοφιλίνης αλλά η ενεργότητα τσαπερόνης της.

Η υπερέκφραση της FtsK σε όλα τα παραπάνω στελέχη δεν παρουσίασε κάποια διαφοροποίηση στην κυτταρική μορφολογία τους υποδηλώνοντας ότι η PpiB στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων πιθανώς δε επιδρά στη λειτουργία της FtsK. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για την περίπτωση των SulA και FtsQ δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα, αφού το σήμα φθορισμού της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης ήταν περιορισμένο τόσο στην υπερέκφρασή τους στο στέλεχος αγρίου τύπου όσο και στο στέλεχος  $\Delta$ *ppiB*.

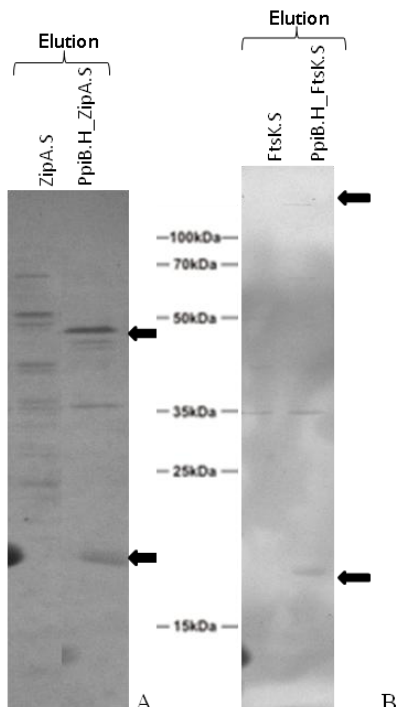
### Γ.2.7.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της PpiB με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση στο βακτηρίο *E. coli*

Στη συνέχεια δεδομένου ότι η παρουσία της PpiB επηρεάζει τη λειτουργία κάποιων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση εξετάστηκε εάν αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν *in vivo* με την PpiB.

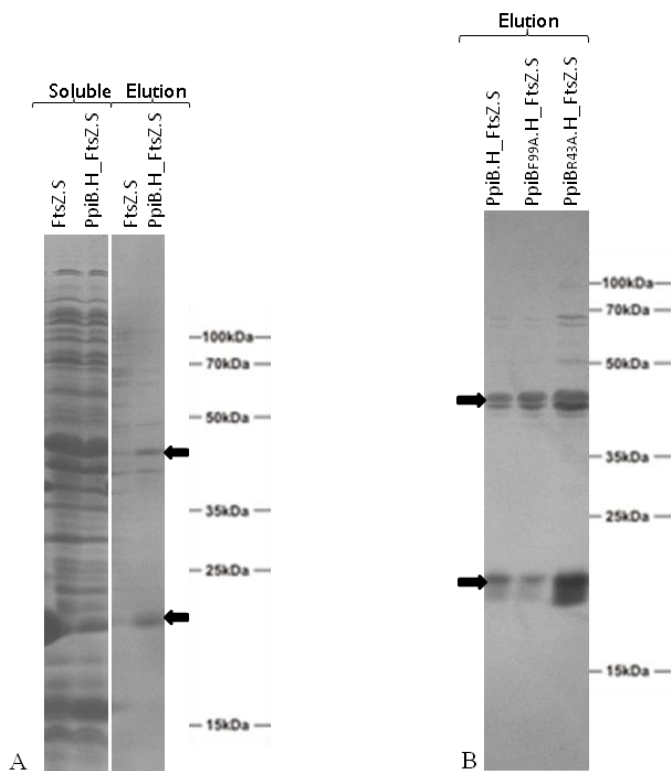
Πραγματοποιήθηκε η συν-έκφραση της PpiB με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα κλωνοποίησης pCDFDuet-1 όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε κύτταρα *E.coli BL21 DE3* απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας.



**Εικόνα Γ.1.47.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη MinC. Έκφραση των MinC<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-MinC<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης 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.



**Εικόνα Γ.2.48.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ZipA, FtsK. Έκφραση των: (A) ZipA<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-ZipA<sub>Stag</sub>, (B) FtsK<sub>Stag</sub>, Prib<sub>His</sub>-FtsK<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης 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.



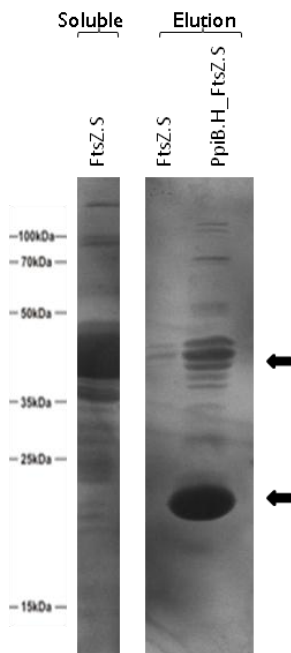
**Εικόνα Γ.2.49.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της (A) PpiB με την FtsZ και (B) της PpiB και των PpiB<sup>F99A</sup> και PpiB<sup>R43A</sup> με την FtsZ. Έκφραση των: FtsZ<sub>Stag</sub>, PpiB<sub>His</sub>-FtsZ<sub>Stag</sub>, PpiB<sub>HisF99A</sub>-FtsZ<sub>Stag</sub> και PpiB<sub>HisR43A</sub>-FtsZ<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης 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.

Με αυτήν τη μέθοδο όπου γίνεται εντοπισμός των σταθερών συμπλόκων πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, ανιχνεύτηκε αλληλεπίδραση της PpiB με τις ZipA και FtsK όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.2.48. και την FtsZ όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.2.49.A. Ενώ παρατηρήθηκε, αγνώστου αιτίας δέσμευση της πρωτεΐνης MinC από τα Ni-NTA σφαιρίδια αгарόζης (Εικόνα Γ.2.47.), με συνέπεια να μην είναι δυνατό κάποιο συμπέρασμα για την αλληλεπίδραση της PpiB με την MinC.

Ακόμα, για να προσδιοριστεί εάν η ενεργότητα PPIάσης της PpiB είναι απαραίτητη για αυτήν την αλληλεπίδραση, ελέγχθηκε και η αλληλεπίδραση μεταξύ της FtsZ και των PpiB<sup>F99A</sup> και PpiB<sup>R43A</sup>. Όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.2.49.B, και στις δύο περιπτώσεις η FtsZ συνεκλούστηκε μαζί με τις μεταλλαγμένες κυκλοφιλίνες ως σταθερό σύμπλοκο πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης, υποδεικνύοντας ότι το ενεργό κέντρο PPIάσης της PpiB, δεν ευθύνεται αποκλειστικά για την αναγνώριση της FtsZ και την αλληλεπίδραση μαζί της.

Στη συνέχεια εξετάστηκε το ενδεχόμενο η PpiB να αναγνωρίζει την αποδιατεταγμένη μορφή των πρωτεϊνών στόχων και να αλληλεπιδρά μαζί τους, αφού για την αποτελεσματική αναδίπλωση των πρωτεϊνών, οι PPIάσες πρέπει να εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Schmidpeter and Schmid, 2015). Για αυτό το σκοπό αφού αποδιατάχθηκαν οι πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης με 8M ουρία εξετάστηκε η αλληλεπίδρασή τους με αυτήν. Με αυτή τη μέθοδο

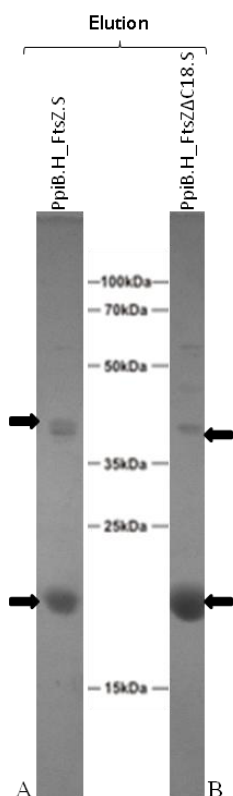
επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της PpiB με την FtsZ αφού η FtsZ συνεκλούστηκε μαζί με την PpiB<sub>His</sub> (Εικόνα Γ.2.50.).



**Εικόνα Γ.2.50.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της PpiB με την FtsZ. Παρουσιάζονται, το κλάσμα της διαλυτής FtsZ<sub>Stag</sub> μετά από αποδιάταξή της με 8M ουρία, τα κλάσματα έκλουσης της FtsZ<sub>Stag</sub> και της FtsZ<sub>Stag</sub> μαζί με την PpiB<sub>His</sub>.

Έχει δειχθεί ότι τα τελευταία 15-20 κατάλοιπα του C-τελικού άκρου της FtsZ είναι εξαιρετικά συντηρημένα στη βακτηριακή FtsZ, γεγονός που υποδηλώνει μια διατηρημένη λειτουργία για αυτήν την περιοχή. Το C-τελικό άκρο της FtsZ σχηματίζει μια περιοχή που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες για το σχηματισμό του Z-δακτυλίου όπως είναι η FtsA, ZipA και MinC/MinD στο *E.coli* και η Ezra και SepF (Ylmf) στο *B.subtilis* (Haney et al., 2001; Singh et al., 2008; Ishikawa et al., 2006, Shen and Lutkenhaus, 2009; Szwedziak et al., 2012).

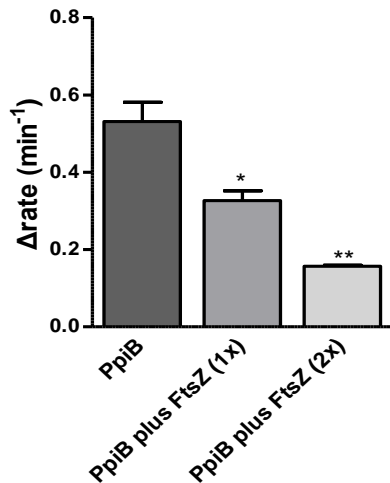
Με σκοπό να διερευνηθεί εάν η αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης με την FtsZ επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης της κυκλοφιλίνης στο C-τελικό άκρο της FtsZ κατασκευάστηκε μια FtsZ πρωτεΐνη που στερείται τα τελευταία 18 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό άκρο της, η FtsZΔC18, αφήνοντας ανέπαφη την περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό της FtsZ (Wang et al., 1997) και εξετάστηκε εάν η έλλειψη της συντηρημένης αυτής αλληλουχίας επηρεάζει την αλληλεπίδραση της με την PpiB (Εικόνα Γ.2.51.). Διαπιστώθηκε, ότι η PpiB συνεχίζει να αλληλεπιδρά και με τη FtsZΔC18, το ποσοστό όμως της αλληλεπίδρασης μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτό της αντίστοιχης αλληλεπίδρασης με την FtsZ αγρίου τύπου επιβιώνοντας ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και ότι το C-τελικό άκρο της FtsZ εμπλέκεται στην αποτελεσματική αναγνώριση και αλληλεπίδρασή τους. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η PpiB συνδέεται με την FtsZ με παρόμοιο τρόπο σύνδεσης με τις γνωστές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την FtsZ και πιθανώς ανταγωνίζεται με αυτές τη δέσμευσή της στην FtsZ κατά την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς αποτρέπει το σχηματισμό του Z-δακτυλίου όταν απαιτείται.



**Εικόνα Γ.2.51.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης της Prib με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες FtsZ και FtsZΔC18. Έκφραση των: (A) Prib<sub>His</sub>-FtsZ<sub>Stag</sub>, (B) Prib<sub>His</sub>-FtsZΔC18<sub>Stag</sub> σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης 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.

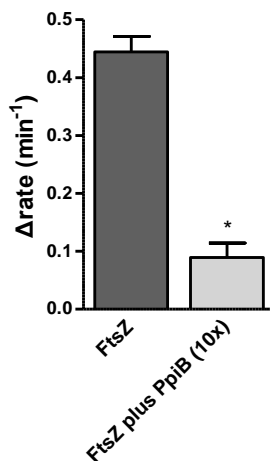
Ακόμα, για να διερευνηθεί περαιτέρω το ενδεχόμενο το ενεργό κέντρο PPIάσης της Prib να εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης με την FtsZ προσδιορίστηκε πόσο ανασταλτικά επιδρά αυτή στην ενεργότητα PPIάσης της Prib. Εάν μια πρωτεΐνη στόχος αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης τότε πιθανώς να ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο με το συνθετικό υπόστρωμα της αντίδρασης οπότε να μειώνεται η μετρούμενη ενζυμική ενεργότητα PPIάσης της κυκλοφιλίνης.

Στην Εικόνα Γ.2.52., παρατηρείται ότι η προσθήκη της FtsZ προκαλεί μείωση της ενεργότητας PPIάσης της Prib. Σε συγκέντρωση 2x μεγαλύτερη από αυτήν της κυκλοφιλίνης, προκαλεί μείωση έως και 30% της ενεργότητας PPIάσης της Prib. Το γεγονός αυτό ίσως υποδεικνύει έναν πιθανό ανταγωνισμό της FtsZ με το υπόστρωμα της αντίδρασης για δεσμευσή της στο ενεργό κέντρο PPIάσης της Prib.



**Εικόνα Γ.2.52.** Μέτρηση της ενεργότητας ΠΡΪάσης της PpiB παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων FtsZ. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

Αφού διαπιστώθηκε ότι η κυκλοφιλίνη αλληλεπιδρά με την FtsZ στη συνέχεια εξετάστηκε εάν η αλληλεπίδραση αυτή έχει κάποια επίδραση στην ενζυμική ενεργότητα της FtsZ. Η FtsZ είναι μια GTPάση η οποία πολυμερίζεται με τρόπο εξαρτώμενο από το GTP σε γραμμικά, μη διακλαδισμένα πρωτοϊνίδια (Romberg and Levin, 2003). Η λειτουργία αυτή προκύπτει σε πρωτοϊνίδια της FtsZ και όχι σε μονομερή επειδή το μόριο GTP δεσμεύεται μεταξύ των γειτονικών υπομονάδων της FtsZ (Li et al., 2013).

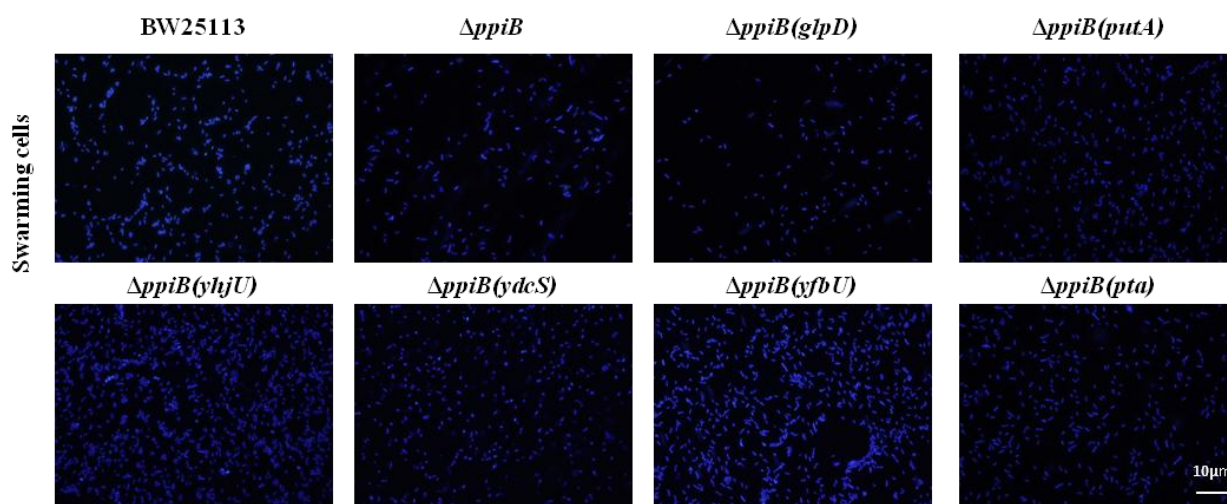


**Εικόνα Γ.2.53.** Μέτρηση της ενεργότητας GTPάσης της FtsZ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων PpiB. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) μέσω του Unpaired t test ( $P < 0,05$ ).

Στην Εικόνα Γ.2.53. παρατηρείται ότι η προσθήκη της PpiB προκαλεί μείωση της ενεργότητας GTPάσης της FtsZ. Σε συγκέντρωση της κυκλοφιλίνης, 10x μεγαλύτερη από της FtsZ η ενεργότητα GTPάσης της μειώνεται κατά 80%, υποδεικνύοντας μία αρνητική επίδραση της PpiB στην ενεργότητα GTPάσης της FtsZ. Ωστόσο, αυτό το αποτέλεσμα δεν υποδεικνύει πραγματικά το ρόλο της PpiB στο πολυμερισμό της FtsZ, δεδομένου ότι μπορεί να ερμηνευθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους. Η PpiB θα μπορούσε να αναστέλλει τον πολυμερισμό της FtsZ απομονώνοντας μονομερή με έναν τρόπο παρόμοιο με τη δράση της SulA (Chen et al., 2012) ή εναλλακτικά θα μπορούσε να προωθήσει την πλευρική σύνδεση μεταξύ των πρωτοϊνιδίων FtsZ ενισχύοντας τη σταθερότητά τους με έναν τρόπο παρόμοιο με τη δράση των Zap πρωτεϊνών (Durand-Heredia et al., 2011; Galli and Gerdes, 2012). Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τον πολυμερισμό της FtsZ παρουσία της PpiB είναι απαραίτητες προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης της PpiB.

#### Γ.2.7.4 Διερεύνηση της δράσης των πρωτεϊνών στόχων της PpiB στη μορφολογία των κυττάρων κατά την ομαδική κίνηση και την εκθετική φάση ανάπτυξης

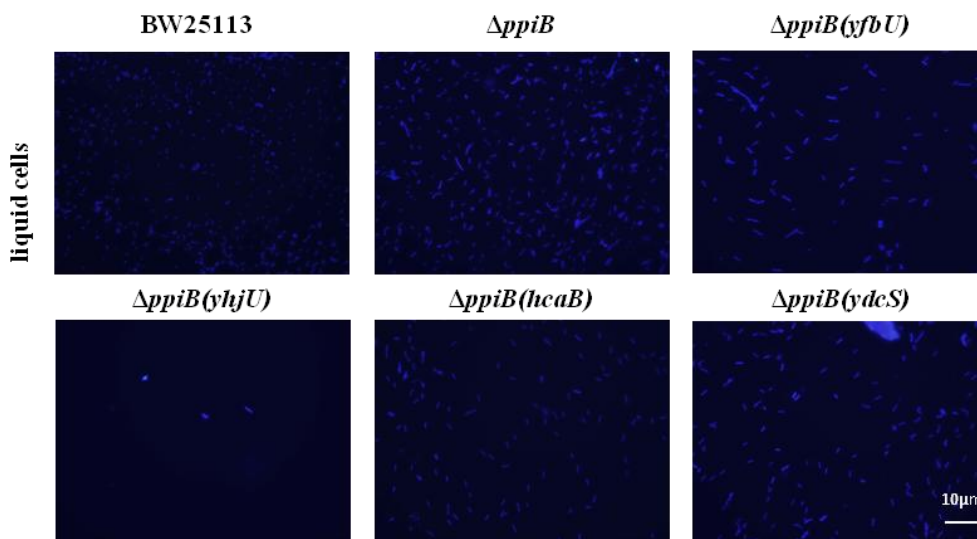
Έχει παρατηρηθεί ότι η κυτταρική μορφολογία του στελέχους *ΔppiB* κατά την ομαδική κίνηση αλλά και κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια παρουσιάζει αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης χωρίς να επηρεάζεται η αντιγραφή του χρωμοσώματος και αύξηση του μήκους των κυττάρων. Λόγω της φύσης της PpiB θεωρήθηκε ότι οι επιπτώσεις της στη κυτταρική διαίρεση θα μπορούσαν πιθανόν επιτευχθούν μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και ρύθμισης των λειτουργιών πρωτεϊνών που δε συμμετέχουν άμεσα στη κυτταρική διαίρεση. Με στόχο να εντοπιστούν πολλαπλοί καταστολείς της κυτταρικής μορφολογίας που παρουσιάζει το στέλεχος *ΔppiB* κατά την ομαδική κίνηση αλλά και κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, εξετάστηκε εάν οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της PpiB (Πίνακας Γ.2.6.), μπορούν να προκαλέσουν αναστολή αυτής της κυτταρικής μορφολογίας, επαναφέροντας την στο πρότυπο του στελέχους αγρίου τύπου. Για το σκοπό αυτόν, παρατηρήθηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών που υπερεκφράζουν καθεμία από αυτές τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους της PpiB στο *ΔppiB* στέλεχος, κατά την ομαδική κίνηση και κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, χρησιμοποιώντας χρώση DAPI.





**Εικόνα Γ.2.54.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔrriB*, *ΔrriB(glpD)*, *ΔrriB(putA)*, *ΔrriB(yhjU)*, *ΔrriB(ydcS)*, *ΔrriB(yfbU)*, *ΔrriB(pta)* κατά την ομαδική κίνηση με χρώση DAPI έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες στόχοι της PpiB που υπερεκφράστηκαν στο *ΔrriB* στέλεχος, παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν ικανές να επαναφέρουν την κυτταρική μορφολογία του στελέχους *ΔrriB* στο πρότυπο του στελέχους αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση, υποδεικνύοντας πιθανώς ότι αυτές δεν εμπλέκονται στο μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης από την κυκλοφιλίνη στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, στην Εικόνα Γ.2.54., παρουσιάζονται τα *ΔrriB* στελέχη που υπερεκφράζουν πιθανές πρωτεΐνες που επαναφέρουν την κυτταρική μορφολογία του στελέχους *ΔrriB*, στα πρότυπα του στελέχους αγρίου τύπου. Η κυτταρική μορφολογία των *ΔrriB* στελεχών που υπερεκφράζουν τις Pta, YdcS, GlpD και YhjU χαρακτηρίζονται από μικρότερα κύτταρα και ο μηχανισμός της κυτταρικής διαίρεσης λειτουργεί καλύτερα, ενώ το *ΔrriB* στέλεχος που υπερεκφράζει την YfbU παρουσιάζει κυτταρική μορφολογία παρόμοια με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Αυτές οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της PpiB είναι ικανές να καταστείλουν τη κυτταρική μορφολογία που παρουσιάζει το στέλεχος *ΔrriB*, ενδεχομένως τροποποιώντας ορισμένες κυτταρικές διεργασίες, προκειμένου να παρακάμψουν τη λειτουργία της PpiB.



**Εικόνα Γ.2.55.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔrriB*, *ΔrriB(hcaB)*, *ΔrriB(yhjU)* και *ΔrriB(yfbU)* κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης με χρώση DAPI, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

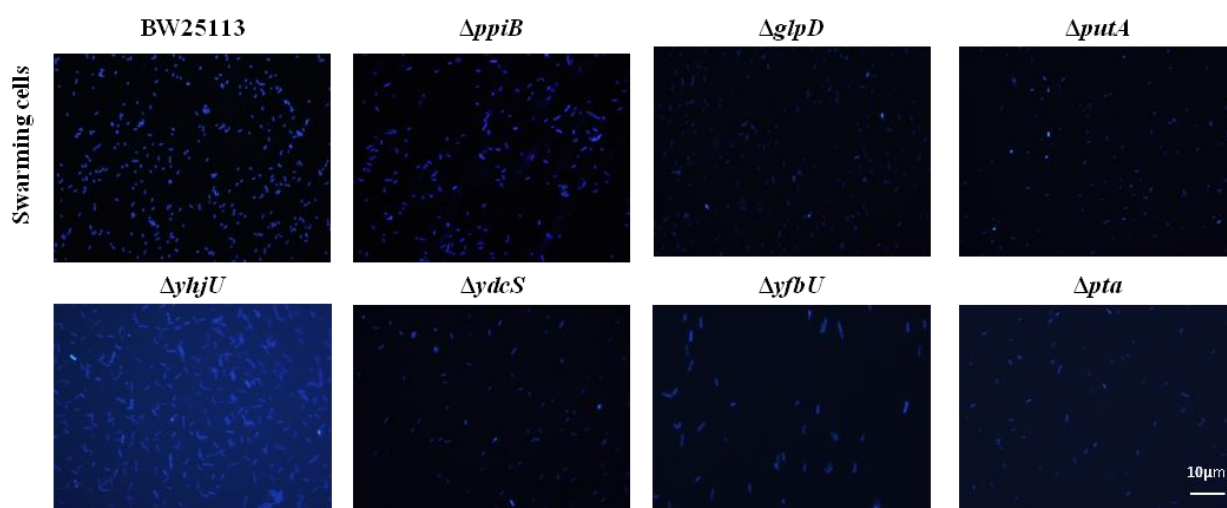
Αντίστοιχα, στην εκθετική φάση ανάπτυξης οι περισσότερες πρωτεΐνες στόχοι της PpiB που υπερεκφράστηκαν στο *ΔrriB* στέλεχος, παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν ικανές να επαναφέρουν την κυτταρική μορφολογία του στελέχους *ΔrriB* στο πρότυπο του στελέχους αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας πιθανώς ότι αυτές δεν εμπλέκονται στο μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης από την κυκλοφιλίνη στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων. Ωστόσο, στην Εικόνα Γ.2.55., παρουσιάζονται τα *ΔrriB* στελέχη που υπερεκφράζουν πιθανές πρωτεΐνες που επαναφέρουν την κυτταρική μορφολογία του στελέχους *ΔrriB*, στα πρότυπα του στελέχους αγρίου τύπου. Η κυτταρική μορφολογία των *ΔrriB* στελεχών που υπερεκφράζουν τις YfbU, YhjU, HcaB, YdcS χαρακτηρίζονται από μικρότερα κύτταρα και ο μηχανισμός της κυτταρικής διαίρεσης λειτουργεί καλύτερα σε σχέση με το



*ΔrpiB* στέλεχος. Αυτές οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της PpiB είναι ικανές να προκαλέσουν καταστολή της κυτταρικής μορφολογίας που παρουσιάζει το στέλεχος *ΔrpiB* κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης, διαφορετικές πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης ενδεχομένως τροποποιώντας ορισμένες κυτταρικές διεργασίες, μπορούν να παρακάμψουν τη λειτουργία της PpiB. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη προκειμένου να καθοριστεί εάν αυτές οι πρωτεΐνες είναι στόχοι της PpiB με σκοπό την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης ή αν εμπλέκονται στις ίδιες ή παρόμοιες οδούς.

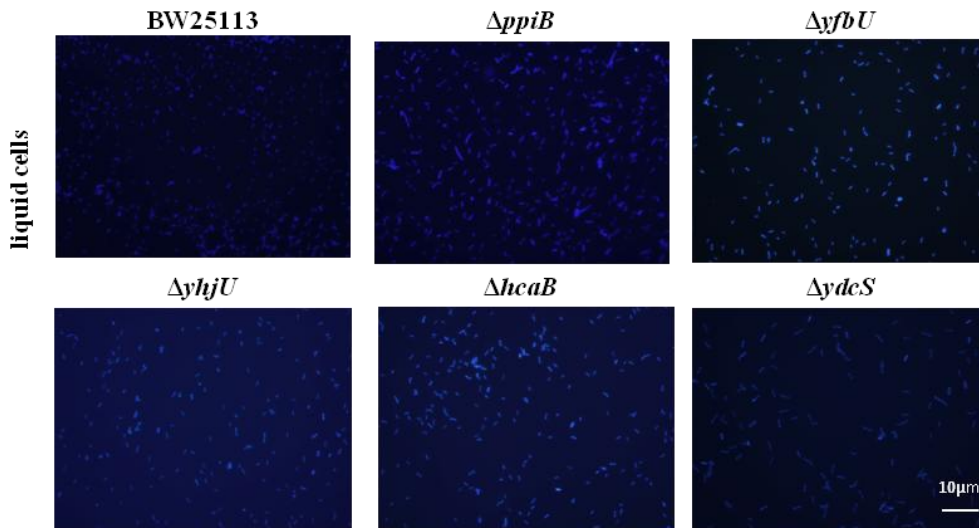
### Γ.2.7.5 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των $\Delta$ (*preys*) στελεχών

Με σκοπό να διερευνηθεί εάν κάθε πρωτεΐνη στόχος της PpiB εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, μελετήθηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών τα οποία φέρουν απαλοιφή του κάθε γονιδίου που κωδικοποιεί για τις προαναφερθείσες πιθανές πρωτεΐνες στόχους της κυκλοφιλίνης, κατά τη διάρκεια της ομαδικής κίνησης και κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων σε υγρή καλλιέργεια.



**Εικόνα Γ.2.56.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔrpiB*, *ΔglpD*, *ΔputA*, *ΔyhjU*, *ΔydcS*, *ΔyfbU*, και *Δpta* κατά την ομαδική κίνηση με χρώση DAPI έπειτα από επώαση στους 30 °C για 20 h, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.56., μόνο τα στελέχη *ΔyhjU* και *ΔyfbU* παρουσιάζουν παρόμοια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελεχούς *ΔrpiB* κατά την ομαδική κίνηση, υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεΐνες YhjU και YfbU εμπλέκονται στο μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης στις συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης και πιθανώς συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης μέσω παρόμοιων ή παράλληλων οδών με την κυκλοφιλίνη παρουσιάζοντας τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος *ΔrpiB*.



**Εικόνα Γ.2.57.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta rpiB$ ,  $\Delta hcaB$ ,  $\Delta yhjU$  και  $\Delta yfbU$  κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης με χρώση DAPI, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Αντίστοιχα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας Γ.2.57., μόνο το στέλεχος  $\Delta ydcS$  παρουσιάζει παρόμοια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελέχους  $\Delta rpiB$  κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη YdcS εμπλέκεται στο μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης υποδηλώνοντας ότι πιθανώς συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης μέσω παρόμοιων ή παράλληλων οδών με την κυκλοφιλίνη παρουσιάζοντας τον ίδιο φαινότυπο με το στέλεχος  $\Delta rpiB$ . Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης και σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης, διαφορετικές πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης πιθανώς συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης μέσω παρόμοιων ή παράλληλων οδών με την κυκλοφιλίνη.

## **Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## Δ. Συζήτηση

Οι πεπτιδύλ-προλύλ *cis/trans* ισομεράσες (ΡΡΙΑσες) αποτελούν μια υπεροικογένεια συντηρημένων κατά την εξέλιξη πρωτεϊνών, που απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίες καταλύουν την αργή διαδικασία της *cis/trans* ισομερίωσης των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται της προλίνης (Fischer and Schmid, 1990). Τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών διακρίνονται σε τρεις οικογένειες: τις κυκλοφιλίνες (Cyclophilins, Cyphs), τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν το FK506 (FKBPs) και τις παρβουλίνες (Parvulins, Pars). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δύο από τις τρεις οικογένειες των ΡΡΙΑσών, οι κυκλοφιλίνες και οι παρβουλίνες, του μικροοργανισμού *Escherichia coli*. Αρχικά, μελετήθηκε ο φυσιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών μέσω της ανάπτυξης, σε διαφορετικές συνθήκες, των *E. coli* στελεχών στα οποία έχει πραγματοποιηθεί απαλοιφή για το συγκεκριμένο γονίδιο που κωδικοποιεί για καθεμία από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο φυσιολογικός ρόλος των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου *E. coli* σε συνθήκες καταπόνησης, στην κινητικότητα και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Στην συνέχεια, εξετάστηκε εάν η ενεργότητα ΡΡΙΑσης αυτών των ενζύμων είναι απαραίτητη στους παρατηρούμενους φαινότυπους. Για αυτό το σκοπό, δημιουργήθηκαν στελέχη τα οποία φέρουν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων που μετέχουν στον ενεργό κέντρο ΡΡΙΑσης κάθε πρωτεΐνης, προσδιορίστηκε η ενζυμική τους ενεργότητα και ελέγχθηκε εάν αυτά τα στελέχη συμπληρώνουν τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Επίσης, ελέγχθηκε η κυτταρική μορφολογία όλων των στελεχών στις παραπάνω συνθήκες και ερευνήθηκε η λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών από τις ΡΡΙΑσες. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψιν ότι τόσο η ομαδική κίνηση όσο και ο σχηματισμός βιοϋμενίου πρέπει να ρυθμίζονται σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο αναζητήσαμε και ελέγξαμε τυχόν αλληλεπιδράσεις των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών με πρωτεΐνες στόχους μέσω των οποίων οι ΡΡΙΑσες εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτών των συνθηκών.

### Δ.1 Ο ρόλος των κυκλοφιλινών και των παρβουλινών στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου *E. coli* σε συνθήκες καταπόνησης

Η σημαντικότητα των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών υποδηλώνεται από την παρουσία τους σε όλους τους οργανισμούς, ενώ αυτές εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο περίπλασμα βακτηριακών κυττάρων. Στο μικροοργανισμό *E. coli*, μέσω της αναζήτησης στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του, εντοπίστηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν για τις παρβουλίνες, *ppiC*, *surA*, *ppiD* και δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τις κυκλοφιλίνες *ppiB*, *ppiA*. Αν και η δομή όλων των παραπάνω πρωτεϊνών έχει μελετηθεί εκτενώς οι γνώσεις μας γύρω από τον βιολογικό τους ρόλο παραμένουν περιορισμένες, γνωρίζουμε όμως ότι όλες καταλύουν την αναδίπλωση του πεπτιδικού δεσμού που προηγείται της προλίνης σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, καθώς όλες παρουσιάζουν ενεργότητα ΡΡΙΑσης, με εξαίρεση την PpiD (Weininger et al. 2010). Επίσης, γνωρίζουμε ότι η παρβουλίνη SurA συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση ορισμένων σημαντικών πορινών της εξωτερικής μεμβράνης (β-barrel OMPs) (Stroud et al., 2010), ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν μεγάλα και αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά στο φυσιολογικό ρόλο της αλλά και όλων των υπολοίπων.

Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη που μελετήθηκαν δεν παρουσιάζουν κάποιον φαινότυπο όταν αυτά αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες (Kleerebezem et al., 1995; Malesević et al., 2010; Justice et al., 2005). Ωστόσο, όταν οι συνθήκες ανάπτυξης μεταβάλλονται ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων στελεχών διαφοροποιείται. Όταν όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις κυκλοφιλίνες και τις FKBP's του *S. cerevisiae* διαγράφηκαν, μεμονωμένα και ομαδικά, δεν βρέθηκε κανένα ελάττωμα σε μια σειρά φυσιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν, δείχνοντας ότι είναι πιο πιθανό απαιτούν συγκεκριμένα ερεθίσματα του περιβάλλοντος ως σηματοδότηση ή να δρουν κάτω υπό συνθήκες στρες (Dolinski et al., 1997). Γνωρίζουμε ότι στο βακτήριο *E. coli*, η μεταγραφή του γονιδίου *rrpD* ρυθμίζεται μέσω του Cpx δυαδικού συστήματος και τον παράγοντα  $\sigma^{32}$  (Dartigalongue and Raina, 1998), ενώ η PpiA επάγεται σε απόκριση προς περιπλασμικές καταπονήσεις όπως αυξημένο pH, όταν ενεργοποιείται το Cpx μονοπάτι (Pogliano et al., 1997). Αυτές οι παρατηρήσεις μας οδήγησαν να μελετήσουμε τα παραπάνω στελέχη σε συνθήκες καταπόνησης.

Η διερεύνηση της συμμετοχής των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών σε συνθήκες καταπόνησης, στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάπτυξης των στελεχών *ΔppiC*, *ΔsurA*, *ΔppiD*, *ΔppiB* και *ΔppiA* σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (42°C) και υψηλής αλατότητας (2% και 5% NaCl). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το στέλεχος *ΔppiB* παρουσίασε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου και ως εκ τούτου συμπεραίνεται ότι η κυκλοφιλίνη PpiB πιθανώς 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 *ΔsurA* παρουσίασε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, αντίθετα με τα στελέχη *ΔppiC*, *ΔppiD* και *ΔppiA* τα οποία παρουσίασαν αυξημένη ικανότητα επιβίωσης, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες SurA, PpiC, PpiD και PpiA πιθανώς να συμμετέχουν, με διαφορετικό τρόπο, στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

Έχει αναφερθεί η συμμετοχή των PPIάσων στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε παράγοντες καταπόνησης. Η συμμετοχή των PPIάσων στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *Enterococcus faecalis* σε ωσμωτικό στρες, έχει δείχθει με δύο γονίδια που κωδικοποιούν για PPIάσες, τα *ef0685* και *ef1534* (Reffuveille et al., 2012). Επίσης, έχει δείχθει η συμμετοχή της παρβουλίνης SurA στην ανθεκτικότητα του *Yersinia pseudotuberculosis* σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Obi et al., 2011). Οι κυκλοφιλίνες έχει δείχθει αρκετές φορές ότι σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των κυττάρων σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Η έκφραση του γονιδίου *cyp1* και *cyp2*, της κυτταροπλασματικής και της εκκριτικής κυκλοφιλίνης του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*, επάγονται σε κατάσταση θερμικού σοκ, ενώ διατάραξη των γονιδίων μειώνει την επιβίωση των κυττάρων μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, υποδεικνύοντας ότι οι κυκλοφιλίνες Cyp1 και Cyp2, παίζουν ρόλο στην απόκριση στο στρες (Sykes et al., 1993). Επίσης, μεταλλαγμένο στέλεχος στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί απαλοιφή και των δύο κυκλοφιλινών *ΔcypAB* στο μικροοργανισμό *Brucella abortus*, επέδειξε αυξημένη ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, το pH, και τα απορρυπαντικά, αλλά και μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Roset et al., 2013). Ακόμα, η PpiB, μία εκκρινόμενη PPIάση του μικροοργανισμού *L. pneumophila*, έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες (Söderberg and Cianciotto, 2008), ενώ στο μικροοργανισμό *E. coli* διάφορες μοριακές συνοδοί συμπεριλαμβανομένων και της PpiA παροδικά επάγονται κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες (Kandror and Goldberg, 1997; Phadtare and Inouye, 2004).

## Δ.2 Ο ρόλος των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών στην κινητικότητα και στο σχηματισμό βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli*.

Τα βακτήρια για την επιβίωσή τους χρειάζεται να προσαρμόζονται διαρκώς στις αλλαγές του περιβάλλοντος τους και ανάλογα με το αν αναπτύσσονται σε ένα υγρό μέσο ή σε επαφή με στερεή επιφάνεια εκτελούν διαφορετικούς τύπους κινητικότητας (Jarrell et al., 2008). Η ομαδική κίνηση σε επιφάνειες αποτελεί ένα τρόπο επιφανειακής μετανάστευσης που επιτρέπει στα βακτήρια τη γρήγορη αποίκιση ενός περιβάλλοντος, τη προστασία έναντι δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών και την αποτελεσματικότερη μόλυσματικότητα (Verstraeten et al., 2008; Hershey, 2003). Περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση των κυττάρων στην άκρη της αποικίας σε επιμήκη, χωρίς διαφράγματα και σε υπερμαστιγοφόρα κύτταρα που υποβάλλουν το πληθυσμό σε ταχεία και συντονισμένη μετανάστευση σε στερεές επιφάνειες. Μπορεί να επηρεαστεί από ενδοκυτταρικούς παράγοντες, για παράδειγμα έναν 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). Αντίθετα, κατά την κολυμβητική κίνηση, μεμονωμένα κύτταρα *E. coli* χρησιμοποιούν τα μαστίγια τους, τα οποία περιστρέφουν για να προωθηθούν (Baker et al., 2006). Η κινητικότητα, αποτελεί ένα κοινό γνώρισμα μεταξύ των βακτηρίων και θεωρείται ότι τους παρέχει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης επιτρεποντάς τους να καταλαμβάνουν οικολογικούς θώκους πλούσιους σε θρεπτικά συστατικά (Venieraki et al., 2016).

Εκτός από την κινητικότητα, ένας ακόμη τρόπος προσαρμογής των βακτηρίων στο περιβάλλον τους είναι ο σχηματισμός των πολυκύτταρων κοινοτήτων γνωστός ως βιοϋμένιο. Στο βιοϋμένιο, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πολυκύτταρα συσσωματώματα, έγκλειστα μέσα σε ένα βλεννώδες πλέγμα αποτελούμενο από πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, και πολυσακχαρίτες που παράγονται από τα ίδια τα βακτήρια. Πολλά βακτηριακά είδη έχουν την ικανότητα να αλλάζουν τον τρόπο ζωής τους μεταξύ πλαγκτονικής ανάπτυξης και ανάπτυξης σε βιοϋμένιο, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι αλλαγές αυτές συνοδεύονται από αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα φαινοτυπικές αλλαγές (Claessen et al., 2014). Τα βιοϋμένια δημιουργούνται σε συστήματα εδάφους και υδάτων, σε ζωντανούς ιστούς καθώς και στις ρίζες και τα φύλλα των φυτών (Donlan, 2001, Rudrappa et al., 2013).

Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου όπως και η ομαδική κίνηση, ενισχύουν την αντίσταση των βακτηρίων σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως αντιβιοτικά, το ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και τη θήρευση (Verstraeten et al., 2008). Όπως αναφέρθηκε οι ΡΡΪάσεις συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε παράγοντες καταπόνησης. Το μεταλλαγμένο στέλεχος της PprC παρουσιάζει μείωση της βιωσιμότητας κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου (Malesević et al., 2010), ενώ το *ΔsurA* στέλεχος παρουσιάζει υπερευαισθησία στο SDS-EDTA, σε υδρόφοβα αντιβιοτικά καθώς και σε άλατα χολικού οξέος (Lazar and Kolter, 1996; Rouvière and Gross, 1996). Επίσης, 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 των κυττάρων απουσία πηγής άνθρακα και για την ανθεκτικότητα αυτών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, όξινου pH και παρουσία ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου (polymyxin B) (Kenyon et al., 2010).

Η μελέτη των Inoue et al. 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 ΡΡΙΑσών. Τα μέλη της υπερικογένειας αλλά και οι τσαπερόνες, πιθανώς επηρεάζουν τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών στόχων του βακτηρίου *E. coli* καθώς αναδιπλώνουν ή αποτρέπουν την συσσωμάτωση πρωτεϊνών που πιθανώς συμμετέχουν έμμεσα ή άμεσα στον μηχανισμό της κινητικότητας (Inoue et al., 2007). Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι τα στελέχη τα οποία φέρουν απαλοιφή των γονιδίων *fkpB*, *ppiB* και *ppiC* εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας από το στέλεχος αγρίου τύπου, συμπεραίνοντας ότι οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται με άγνωστο, ωστόσο, τρόπο στην ομαδική κίνηση του βακτηρίου *E. coli* (Inoue et al., 2007). Αντίστοιχη, μελέτη στην οποία χαρακτηρίστηκαν τα ίδια μεταλλαγμένα στελέχη του *E. coli* αυτή τη φορά για την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοϋμενίο, κατέδειξε ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔsurA* εμφάνισε μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου (Niba et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά μας παρακίνησαν να εξετάσουμε την ικανότητα ομαδικής κίνησης, κολυμβητικής κίνησης αλλά και σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔppiC*, *ΔsurA*, *ΔppiD*, *ΔppiB* και *ΔppiA*.

Τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔppiC* και *ΔppiB* εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κινητικότητας αλλά και αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113, υποδηλώνοντας ότι οι PpiC και PpiB δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές τόσο της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης, όσο και του σχηματισμού βιοϋμενίου. Το μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔsurA* παρουσίασε αυξημένη ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κινητικότητας αλλά απώλεσε την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, όπως έχει παρατηρηθεί ξανά (Niba et al., 2007), υποδηλώνοντας ότι η παρβουλίνη SurA δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης αλλά ως θετικός ρυθμιστής του σχηματισμού βιοϋμενίου. Τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔppiD* και *ΔppiA* παρουσιάζουν την ίδια ικανότητα ομαδικής κινητικότητας με το στέλεχος αγρίου τύπου, άρα οι PpiD και PpiA, δεν αποτελούν ρυθμιστές αυτής. Το στέλεχος *ΔppiD* παρουσίασε μειωμένη ικανότητα κολυμβητικής κινητικότητας και σχηματισμού βιοϋμενίου συγκριτικά με το BW25113, άρα η PpiD δρα ως θετικός ρυθμιστής αυτών. Ενώ, το στέλεχος *ΔppiA* εμφάνισε μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου αλλά ίδια ικανότητα κολυμβητικής κινητικότητας σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας ότι η PpiA δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του σχηματισμού βιοϋμενίου αλλά δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση της κολυμβητικής κίνησης.

Υπάρχουν παράδειγματα συμμετοχής των ΡΡΙΑσών στην κινητικότητα και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Η απαλοιφή του γονιδίου *cj0596* του βακτηρίου *Campylobacter jejuni*, το οποίο είναι ομόλογο της SurA, προκαλεί ελαφρώς μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης αλλά μεγαλύτερη κινητικότητα και μολυσματικότητα στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ παρατηρήθηκαν επίσης αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης αρκετών πρωτεϊνών (Rathbun et al., 2009). Η λιποπρωτεΐνη GldI του μικροοργανισμού *F. johnsoniae*, η οποία εμφανίζει ομολογία με τις FKBP, βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για την κινητικότητα gliding (McBride and Braun, 2004). Επίσης, όσον αφορά στην ικανότητα της ομαδικής κίνησης του βακτηρίου *P. mirabilis*, παρατηρήθηκε αύξηση των μεταγραφημάτων του γονιδίου που κωδικοποιεί για την FklB (Pearson et al., 2010).

Μια πρώτη προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού δράσης των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών ως ρυθμιστών της κινητικότητας και της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, ήταν να εξεταστεί εάν η ενεργότητα ΡΡΙΑσής αυτών των ενζύμων είναι απαραίτητη για τους φαινότυπους που παρατηρήθηκαν. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν στελέχη τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο κάθε ενζύμου και στην πορεία ελέγχθηκε εάν αυτά τα στελέχη συμπληρώνουν τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔppiC*, *ΔsurA*, *ΔppiD*, *ΔppiB* και *ΔppiA* στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου.



Οι παρβουλίνες PpiC και SurA διαθέτουν ενεργότητα PPIάσης (Scholz et al., 1997a; Behrens et al., 2001), ενώ η παρβουλίνη PpiD δεν διαθέτει ενεργότητα PPIάσης (Weininger et al. 2010), έτσι κατασκευάστηκαν πρωτεΐνες που φέρουν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων τα οποία μετέχουν στο ενεργό κέντρο PPIάσης των δύο παρβουλινών. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε *in vitro* η μείωση της ενεργότητας PPIάσης και προσδιορίστηκε η ικανότητα παρεμπόδισης δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη PpiC<sub>C41A</sub> παρουσίασε μείωση της ενεργότητας PPIάσης σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε σχέση με την ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου PpiC, ενώ και οι δύο πρωτεΐνες δε διαθέτουν ιδιαίτερα υψηλή ενεργότητα τσαπερόνης. Στη συνέχεια, οι PpiC και PpiC<sub>C41A</sub> εκφράστηκαν τόσο στο στέλεχος *ΔppiC*, όσο και στο στέλεχος αγρίου τύπου σε συνθήκες ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης, όπως και σχηματισμού βιοϋμενίου. Διαπιστώθηκε ότι η PpiC φαίνεται να συμμετέχει στην ομαδική, κολυμβητική κινητικότητα και στο σχηματισμό βιοϋμενίου του *E. coli*, όχι με την ιδιότητα της PPIάσης, αλλά πιθανότατα με την ιδιότητα της τσαπερόνης. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι μια ουσιαστικά ανενεργός PPIάση, μεταλλαγμένη στο ενεργό κέντρο, μπορεί να εξακολουθεί να είναι λειτουργική *in vivo*. Έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα PPIάσης της SurA, δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της ως μοριακής συνοδού αφού η απαλοιφή των δύο τομέων PPIάσης της σε μια παραλλαγή της SurA, δεν μειώνει την ικανότητα της ως μοριακής συνοδού και επαναφέρει σχεδόν πλήρως το φαινότυπο των *ΔsurA* στελεχών (*in vivo*) (Behrens et al., 2001). Ακόμα, αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητα PPIάσης της SlyD δεν εμπλέκεται στους διάφορους ρόλους που διαδραματίζει στην ωρίμανση της υδρογονάσης, αφού αυτοί επιτυγχάνονται με τη λειτουργία της ως μοριακής συνοδού (Zhang et al., 2005; Chung και Zampale, 2011).

Επίσης, οι κυκλοφιλίνες PpiA και PpiB διαθέτουν ενεργότητα PPIάσης (Compton et al., 1992) και κατασκευάστηκαν αντίστοιχα οι πρωτεΐνες PpiA<sub>F128A</sub>, PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> που φέρουν μεταλλάξεις αμινοξέων τα οποία μετέχουν στον ενεργό κέντρο PPIάσης τους. Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη PpiA<sub>F128A</sub> παρουσίασε μείωση της ενζυμικής της ενεργότητας κατά 97% περίπου σε σχέση με την ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου PpiA ενώ και οι δύο πρωτεΐνες PpiA και PpiA<sub>F128A</sub> δεν διαθέτουν ενεργότητα τσαπερόνης. Επίσης, οι ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> παρουσίασαν μείωση της ενζυμικής τους ενεργότητας κατά 47% και 98% αντίστοιχα, σε σχέση με την ενζυμική ενεργότητα της πρωτεΐνης αγρίου τύπου, ενώ η πρωτεΐνη PpiB<sub>F99A</sub> διατηρεί σχεδόν ακέραιη την τσαπερόνης της, η PpiB<sub>R43A</sub> παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη ενεργότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου PpiB, συμπεραίνοντας ότι η απώλεια της ενεργότητας PPIάσης της PpiB<sub>R43A</sub> επηρεάζει την λειτουργία της ως τσαπερόνη. Διαπιστώθηκε ότι η PpiB φαίνεται να συμμετέχει στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση του *E. coli*, όχι με την ιδιότητα της PPIάσης, αλλά πιθανότατα με την ιδιότητα της τσαπερόνης, ενώ η ενεργότητα PPIάσης της PpiA πιθανότατα δε σχετίζεται με τη δράση της ως αρνητικού ρυθμιστή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Αντίθετα, η ενεργότητα PPIάσης της PpiB φαίνεται ότι είναι σημαντική για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του *E. coli*, καθώς η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *ppiB<sub>R43A</sub>* διατήρησε τον φαινότυπο του στελέχους *ΔppiB*, που θα μπορούσε να προκύψει από την αδυναμία να αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους. Παρά το γεγονός ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης ρυθμίζεται από τη διαμόρφωση των αμινοξέων που προηγούνται της προλίνης και ως εκ τούτου επηρεάζεται από την ενεργότητα PPIάσης, ορισμένες PPIάσες μπορούν να ρυθμίσουν τις βιολογικές διαδικασίες ανεξάρτητα από την καταλυτική τους λειτουργία ως ισομεράσες (Gudavicius et al., 2013). Η απώλεια ενεργότητας της PpiB<sub>R43A</sub> υποδεικνύει ότι η καταλυτική περιοχή της PpiB μπορεί λειτουργεί διαφορετικά από την ενζυματική ενεργότητα PPIάσης της.

Συνολικά η απενεργοποίηση των γονιδίων των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών προκάλεσε διάφορους φαινότυπους που σχετίζονται με την κινητικότητα, υποδεικνύοντας ότι και οι δύο οικογένειες είναι απαραίτητες για την αναδίπλωση και τη λειτουργία κάποιων πρωτεϊνών στόχων, οι οποίες πιθανώς εμπλέκονται στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση, καθώς και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, πιθανώς ευθύνεται η ενεργότητα τσαπερόνης τους για την επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργότητα PPIάσης δεν είναι απαραίτητη για την αναδίπλωση και τη λειτουργία της πλειονότητας των πρωτεϊνών στόχων. Εξαιρέση αποτελεί η κυκλοφιλίνη PpiB όπου η ενεργότητα PPIάσης ήταν απαραίτητη για την επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου, υποδεικνύοντας την πιθανή αδυναμία της να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους.

### Δ.3 Λειτουργική υποκατάσταση των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών από τις PPIάσες

Ένα χρήσιμο και ιδιαίτερα δημοφιλές εργαλείο της μοριακής γενετικής που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται λειτουργικά με ένα προς μελέτη γονίδιο είναι η τεχνική της επαναφοράς του φυσιολογικού φαινοτύπου του βακτηρίου 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 συλλογή ASKA, που μέρος της χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αποτελείται από σχεδόν όλα τα γονίδια του *E. coli* τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί σε φορείς έκφρασης (Kitagawa et al., 2005). Επίσης, είναι διαθέσιμη μια συλλογή περίπου 4000 μεταλλαγμένων στελεχών (KEIO collection) στα οποία έχει απενεργοποιηθεί ένα οποιοδήποτε επιθυμητό γονίδιο, στελέχη της οποίας χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η χρήση των δυο γενετικών συλλογών μας παρείχε 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. Οι φαινότυποι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν αυτοί της ομαδικής κίνησης, της κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου με στόχο να εντοπιστούν τα γονίδια της υπεροικογένειας των PPIάσων τα οποία προκαλούν επαναφορά των φαινοτύπων, στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

Διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIάσων έχουν την δυνατότητα επαναφοράς του φυσιολογικού φαινοτύπου στο στέλεχος *Δp*rr*iC* σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου εκτός από την TF (tig). Η κυκλοφιλίνη PpiA και όλες οι FKBP's έχουν τη δυνατότητα επαναφοράς του φαινοτύπου του στελέχους *Δp*rr*iC* κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση ενώ κατά την κολυμβητική κίνηση ο φαινότυπος του επαναφέρεται και από την υπερέκφραση της SurA. Επίσης παρατηρήθηκε ότι, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIάσων μπορούν να υποκαταστήσουν τη λειτουργία της SurA εκτός από την PpiC κατά την κολυμβητική κίνηση. Αντιθέτως, σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου κανένα μέλος της υπεροικογένειας δε μπορεί να υποκαταστήσει πλήρως την λειτουργία της SurA. Ακόμα, όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIάσων, εκτός από τις FklB, TF και SurA, έχουν την δυνατότητα επαναφοράς του φυσιολογικού φαινοτύπου στο στέλεχος *Δp*rr*iD* κατά την κολυμβητική κίνηση.

Παρομοίως, διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλη της οικογένειας των FKBP's έχουν την δυνατότητα επαναφοράς του φυσιολογικού φαινότυπου στο στέλεχος *ΔrriB* και για τις τρεις συνθήκες εκτός από την TF η οποία δε μπορεί να επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους *ΔrriB* σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Επίσης, η περιπλαστική κυκλοφιλίνη PpiA δε μπορεί να επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους *ΔrriB* κατά την ομαδική κίνηση. Από την οικογένεια των παρβουλινών η PpiC επαναφέρει το φαινότυπο του στελέχους *ΔrriB* σε όλες τις συνθήκες, ενώ η PpiD δε μπορεί να τον επαναφέρει κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και η SurA σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Εξετάζοντας την λειτουργική υποκατάσταση της PpiA σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλη της υπερκοογένειας των PPIασών έχουν την δυνατότητα υποκατάστασης της λειτουργίας της PpiA, εκτός από τις FklB, TF και SurA.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν, ότι σε κάθε περίπτωση, υπάρχουν περισσότερα από ένα άλλο μέλος της υπερκοογένειας των PPIασών που μπορεί να επαναφέρει το φυσιολογικό φαινότυπο της ομαδικής και κολυμβητικής κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔsurA*, *ΔrriD*, *ΔrriC*, *ΔrriA* και *ΔrriB* αν και ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει να διευκρινιστεί. Ένας πιθανός τρόπος δράσης είναι ότι οι διαφορετικές PPIάσες, όταν είναι άφθονες, πιθανώς αναγνωρίζουν μη επιλεκτικά υποστρώματα προς ισομερείωση και πιθανώς δρουν στα υποστρώματα άλλων PPIασών. Ένας εναλλακτικός τρόπος δράσης μέσω του οποίου θα μπορούσε να αντισταθμιστεί η απώλεια της δραστηριότητας των μελετούμενων PPIασών, είναι οι υπόλοιπες PPIάσες που επαναφέρουν τον φαινότυπο τους, να συμμετέχουν σε παρόμοιες ή παράλληλες οδούς, μέσω των κοινών υποστρωμάτων ή των δικών τους ειδικών υποστρωμάτων (*bypass multicopy suppression*) (Forsburg, 2001).

Πιθανώς λοιπόν οι PPIάσες να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στις τρεις συνθήκες μελέτης. Ο τρόπος με τον οποίον αλληλεπιδρούν με αυτές, δηλαδή μέσω του ενεργού κέντρου PPIάσης ή μέσω μιας ή περισσότερων δομικών περιοχών τσαπερόνης φαίνεται ότι είναι διαφορετικός για την καθεμία από αυτές, όπως αναφέρθηκε και παράπανω. Ωστόσο, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί εάν η υπερέκφραση των PPIασών που παρουσιάζουν μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα PPIάσης υποκαθιστά την αντίστοιχη άγριου τύπου PPIάση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες που έδωσαν τα πρώτα στοιχεία για τη λειτουργική υποκατάσταση μεταξύ των μελών των PPIασών. Η υπερέκφραση των γονιδίων *cpr1*, *cpr6* και *cpr7* των κυκλοφιλινών του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*, βρέθηκε ότι μπορεί να υποκαταστήσει την λειτουργία της παρβουλίνης Ess1 και συγκεκριμένα η ενζυμική λειτουργία της κυκλοφιλίνης A (γονίδιο *cpr1*) είναι απαραίτητη για αυτή την υποκατάσταση. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η κυκλοφιλίνη A και η παρβουλίνη Ess1 λειτουργούν σε παράλληλα μονοπάτια και δρουν σε κοινούς στόχους με έναν μηχανισμό δράσης που απαιτεί τον πεπτιδύλ-προλύλ ισομερισμό (Agrévalo-Rodríguez et al., 2000). Η κυκλοφιλίνη A αναγνωρίστηκε και ως ένας από τους έξι καταστολείς του θερμοευαίσθητου φαινότυπου που παρουσιάζουν τα κύτταρα στα οποία έχει μεταλλαχθεί το γονίδιο της παρβουλίνης Ess1 (Wu et al., 2000; Mendu et al., 2010) υποδηλώνοντας ότι η κυκλοφιλίνη A υποκαθιστά λειτουργικά την παρβουλίνη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι μεταξύ των ειδικών υποστρωμάτων της SurA και της PpiD υπάρχει μια μερική αλληλοεπικάλυψη (Stymest and Klappa, 2008).

Ένα ακόμα παράδειγμα λειτουργικής υποκατάστασης ανάμεσα στα μέλη της υπερκοογένειας των PPIασών αποτελεί το γεγονός ότι η υπερέκφραση της FkpA προκαλεί την επαναφορά του φυσιολογικού φαινότυπου στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔsurAΔskp*, υπό συνθήκες θερμικού σοκ (Ge et al., 2014). Επίσης, η υπερέκφραση της παρβουλίνης PpiD μπορεί να επαναφέρει το φαινότυπο της θνησιμότητας από ένα στέλεχος *ΔsurAΔskp* και να συμπληρώσει τις ατέλειες στην ανάπτυξη που προκύπτουν από ένα τριπλό μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔfkpAΔsurAΔrriD* (Matern et al., 2010).

#### Δ.4 Η επίδραση των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών στην κυτταρική μορφολογία

Η συμμετοχή των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών στην κυτταρική διαίρεση έχει δείχθει κυρίως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η παρβουλίνη της ζύμης *Ess1* απαιτείται για τη μίτωση, δεδομένου ότι η απώλεια λειτουργίας της, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μίτωσης και τον κατακερματισμό του πυρήνα (Lu et al., 1996). Η ανθρώπινη παρβουλίνη *Pin1* έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και καθορίζει την πορεία των γεγονότων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, ρυθμίζοντας πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μίτωση (Lu and Zhou, 2007; Xu and Manley, 2007). Παρεμπόδιση ή διαγραφή της *Pin1* οδηγεί την παγίδευση του κυττάρου στο στάδιο της μίτωσης, με συμπύκνωση της χρωματίνης και καταστροφή του (Lu et al., 1996). Ενώ, έχει δείχθει η συμμετοχή της *Pin1* στην κυτταροκίνηση, όπου εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού που φέρουν απαλοιφή του γονιδίου *hpin1* παρουσιάζουν καθυστέρηση στην κυτταροκίνηση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η *Pin1* εντοπίζεται στο δακτύλιο ενδιάμεσου σώματος, ρυθμίζοντας τα τελικά στάδια της κυτταροκίνησης δεσμεύοντας και σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη *Cep55*, βασικό στοιχείο του δακτυλίου (van der Horst and Khanna, 2009; van der Horst et al., 2009). Ακόμα, η κυτταροπλασματική *CypA* υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα και προάγει τη μετάσταση (Yang et al., 2007; Howard et al., 2005) ενώ έχει βρεθεί ότι είναι πρωτεΐνη του κεντροσώματος, το οποίο αποτελεί μέρος των πόλων της ατράκτου κατά τη διάρκεια της μίτωσης και του ενδιάμεσου σώματος κατά τη διάρκεια της τελόφασης, όπου ρυθμίζει την αποκοπή. Η ενεργότητα ισομεράσης της *CypA* δεν απαιτείται για την στόχευση της στο κεντρόσωμα ή το ενδιάμεσο σώμα, ωστόσο είναι απαραίτητη για την έγκαιρη ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης (Bannon et al., 2012). Το γονίδιο *fpr3*, που κωδικοποιεί για μια πεπτιδύλ-προλύλ *cis-trans* ισομεράση του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*, εμπλέκεται στο μονοπάτι ελέγχου του μειωτικού ανασυνδυασμού (Macqueen and Roeder, 2009). Επίσης, στο μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, η κυκλοφιλίνη A αλληλεπιδρά με δύο συμπλέγματα πυρηνικών αποακετυλασών των ιστονών, τις *Sin3-Rpd3* και *Set3C*, τα οποία αμφότερα ελέγχουν τη μειωτική διαδικασία, ενώ έχει εντοπιστεί στον πυρήνα σε κύτταρα ζύμης όπου διέπει το γονιδιακό πρόγραμμα της μείωσης για να προωθήσει την αποτελεσματική σπορίωση. Η ενεργότητα ισομεράσης της κυκλοφιλίνης A είναι απαραίτητη για αυτήν την μειωτική λειτουργία (Arevalo-Rodriguez and Heitman, 2005).

Αρκετοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι παρουσιάζουν την ικανότητα της ομαδικής κίνησης, μεταβάλλουν τη μορφολογία τους σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης δηλαδή εμφανίζουν μια κυτταρική επιμήκυνση (Verstraeten et al., 2008). Προκειμένου να διαπιστωθεί η οποιαδήποτε μεταβολή της κυτταρικής μορφολογίας, αρχικά παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα κύτταρα των στελεχών *ΔrpiC*, *ΔsurA*, *ΔrpiD*, *ΔrpiB* και *ΔrpiA* κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και συγκρίθηκαν με τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου, διαπιστώνοντας ότι η κυτταρική μορφολογία των μεταλλαγμένων στελεχών είναι παρόμοια με αυτή του στελέχους αγρίου τύπου, εκτός από το στέλεχος *ΔrpiB* παρουσιάζει ελαφρώς επιμηκυσμένα κύτταρα στην ομαδική κίνηση, με τέσσερα πυρηνοειδή ανά κύτταρο, υποδεικνύοντας ότι η διαγραφή του *EcrrpiB* γονιδίου πιθανώς προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης χωρίς να επηρεάζεται η αντιγραφή του χρωμοσώματος.

Επίσης, διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των διάφορων ΡΡΙΑσών στα μεταλλαγμένα στελέχη των παρβουλινών και της κυκλοφιλίνης *PriB* επηρεάζει τη κυτταρική μορφολογία στην ομαδική κίνηση και στη κολυμβητική κίνηση. Παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση συγκεκριμένων ΡΡΙΑσών προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης σε αυτές τις συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι για την παρατηρούμενη μορφολογία δεν ευθύνεται μόνο η υπερέκφραση κάποιων συγκεκριμένων ΡΡΙΑσών αλλά και η έλλειψη των αντίστοιχων ΡΡΙΑσών. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι μεγάλη σημασία έχουν και οι

συνθήκες ανάπτυξης αφού τα αποτελέσματα της ομαδικής κίνησης διαφέρουν από αυτά της κολυμβητικής.

Στην συνέχεια, παρατηρήθηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*ppiC*), BW25113(*ppiC<sub>C41A</sub>*),  $\Delta$ *ppiC(ppiC)*,  $\Delta$ *ppiC(ppiC<sub>C41A</sub>)*, BW25113(*ppiB*), BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>*), BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>*), όπως και των  $\Delta$ *ppiB(ppiB)*,  $\Delta$ *ppiB(ppiB<sub>F99A</sub>)* και  $\Delta$ *ppiB(ppiB<sub>R43A</sub>)* κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και συγκρίθηκαν με τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου. Διαπιστώθηκε ότι η PpiC και η PpiB εμπλέκονται στη κυτταρική διαίρεση σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, πιθανώς ως αρνητικοί ρυθμιστές, αφού η υπερέκφραση των γονιδίων *ppiC* και *ppiB* προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, δημιουργώντας επιμηκυσμένα κύτταρα τα οποία σχηματίζουν πολλαπλά πυρηνοειδή. Η ελλειπής κυτταρική διαίρεση των κυττάρων αυτών πιθανότατα οφείλεται στην υψηλή ενεργότητα ΡΡΙάσης τους αφού όταν υπερεκφράζονται τα μεταλλαγμένα γονίδια *ppiC<sub>C41A</sub>*, *ppiB<sub>F99A</sub>* και *ppiB<sub>R43A</sub>* τα κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία, παρόμοια με την αντίστοιχη του στελέχους αγρίου τύπου. Αντίθετα με την ομαδική κίνηση, η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*ppiC*), BW25113(*ppiC<sub>C41A</sub>*),  $\Delta$ *ppiC(ppiC)*,  $\Delta$ *ppiC(ppiC<sub>C41A</sub>)* κατά την κολυμβητική κίνηση δε διαφοροποιείται. Ενώ, η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*ppiB*), BW25113(*ppiB<sub>F99A</sub>*), BW25113(*ppiB<sub>R43A</sub>*), όπως και των  $\Delta$ *ppiB(ppiB)*,  $\Delta$ *ppiB(ppiB<sub>F99A</sub>)* και  $\Delta$ *ppiB(ppiB<sub>R43A</sub>)* στην κολυμβητική κίνηση, είναι παρόμοια με αυτήν που παρουσιάζουν τα στελέχη αυτά στην ομαδική κίνηση.

#### **Δ 4.1. Διερεύνηση της συμμετοχής των PpiC και PpiB στην κυτταρική διαίρεση**

Επειδή όπως αναφέρθηκε παραπάνω η διαγραφή ή η υπερέκφραση της PpiB όπως και η υπερέκφραση της PpiC οδηγούν σε διάφορους βαθμούς αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης εξετάστηκε εάν η PpiB και η PpiC πιθανώς ενεργοποιούν αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης ή αδρανοποιούν προαγωγείς της κυτταρικής διαίρεσης ή ακόμα και ρυθμίζουν τη λειτουργία ορισμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη κυτταρική διαίρεση. Η κυτταρική διαίρεση στα βακτήρια περιλαμβάνει την ανάπτυξη των στρωμάτων του κυτταρικού φακέλου, το κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη, σχηματίζοντας ένα διάφραγμα μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων που έχουν προκύψει μετά τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού. Ο σχηματισμός του διαφράγματος οδηγείται από ένα σύμπλεγμα πολλών πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται στην θέση της διαίρεσης, πριν από την ανάπτυξη του διαφράγματος. Το πρώιμο στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης στα βακτήρια είναι ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου (Harry, 2001). Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του Z-δακτυλίου χωρίζονται σε δύο διακριτές ομάδες, αυτές που συμμετέχουν νωρίς και αυτές που εμπλέκονται λίγο αργότερα. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις FtsZ, FtsA, και ZipA οι οποίες φθάνουν ταυτόχρονα στο σημείο σχηματισμού του δακτυλίου, ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI, και FtsN οι οποίες φθάνουν με μία σαφή καθυστέρηση. Ο εντοπισμός αυτής της τελευταίας ομάδας εξαρτάται από την πρώτη ομάδα και φτάνει σχεδόν ταυτόχρονα με το σχηματισμό του πλήρους διαφραγματικού δακτυλίου (Lutkenhaus, 2007). Ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου καθορίζει τη θέση της μελλοντικής κυτταρικής διαίρεσης και αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της χρονικής ρύθμισης της κυτταροκίνησης. Η έναρξη της συναρμολόγησης ελέγχεται αυστηρά από την FtsZ, τόσο χρονικά όσο και χωρικά ώστε να αποτραπεί ανώμαλη διαφραγματοποίηση. Ως πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της PpiC και της PpiB εξετάστηκαν οι FtsZ, ZipA, FtsK, FtsQ που συμμετέχουν στο σχηματισμό του Z-δακτυλίου και οι MinC και SulA που αποτελούν αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης.

Το γονίδιο *ftsZ* παίζει κεντρικό ρόλο στη διαίρεση και η δράση της FtsZ αρχίζει στα πρώτα στάδια του σχηματισμού του διαφράγματος. Η FtsZ θεωρείται η προγονική ομόλογος των ευκαρυωτικών τουμπουλίνων (Nogales et al., 1998), ενώ το γονίδιο *ftsZ* είναι ένα πολύ συντηρημένο γονίδιο της κυτταρικής διαίρεσης, παρόν στα περισσότερα βακτήρια και Αρχαία (Margolin, 2005). Όπως η τουμπουλίνη, υποβάλλεται *in vitro* σε GTP-εξαρτώμενο πολυμερισμό ενώ και για τις δύο η βασική μονάδα συναρμολόγησης είναι τα πρωτοϊνίδια, σε μια γραμμική διάταξη υπομονάδων κεφαλής-ουράς (Lutkenhaus, 2007). Το αμινοτελικό της άκρο διαθέτει θέση δέσμευσης του GTP (Oliva et al., 2004) και η υδρόλυση του GTP χρησιμοποιείται για τον ολιγομερισμό των μονομερών της FtsZ κατά το σχηματισμό του δακτυλίου. Ο Z-δακτύλιος φαίνεται να είναι μια δυναμική δομή, οι υπομονάδες της οποίας ανταλλάσσονται συνεχώς με ελεύθερες μονάδες από την κυτταροπλασματική δεξαμενή (Anderson et al., 2004). Ο σχηματισμός του Z-δακτυλίου απαιτεί την παρουσία μιας πρωτεΐνης που μπορεί να προσδέσει τα FtsZ νημάτια στη μεμβράνη. Στο *E. coli*, τόσο η ZipA όσο και η FtsA μπορούν να επιτελέσουν αυτό το ρόλο. Αυτές οι πρωτεΐνες δεσμεύονται σε μια σύντομη διατηρημένη περιοχή κοντά στο C-τελικό άκρο της FtsZ καθώς και με τη μεμβράνη (Haney et al., 2001). Η ZipA προσδέσεται στη μεμβράνη μέσω ενός N-τελικού διαμεμβρανικού τμήματος. Η FtsA επίσης μαζί με τη ZipA, απαιτείται για την πρόσληψη όλων των μετέπειτα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό του Z-δακτυλίου (Lutkenhaus et al., 2012). Η FtsK, είναι μια DNA μεταθετάση η οποία όταν βρίσκεται στο διάφραγμα είναι ικανή να μετατοπίζει το DNA μακριά από αυτό και είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των διμερών χρωμοσωμάτων, που έχουν δημιουργηθεί μέσω γενικού ανασυνδιασμού, σε μονομερή μέσω της μετατόπισής της κατά μήκος του DNA και της αλληλεπίδρασής της με το σύστημα ειδικού ανασυνδιασμού XerCD (Bigot et al., 2005).

Η PpiC σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της λειτουργίας της FtsZ, της ZipA και της FtsK. Η υπερέκφραση της FtsZ κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης και την ομαδική κίνηση προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, ενώ όταν εκφράζεται στο στέλεχος *ΔrpiC*, παρατηρούνται λιγότερα επιμηκυσμένα κύτταρα. Φαίνεται ότι η PpiC δεν εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση της FtsZ. Διαπιστώθηκε ότι η παρβουλίνη σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο αλληλεπίδρασης με την FtsZ, ενώ στην αποτελεσματική αναγνώριση και αλληλεπίδραση μεταξύ τους εμπλέκεται το C-τελικό άκρο της FtsZ, αφού απαλοιφή του είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της αλληλεπίδρασης. Τα τελευταία 15-20 κατάλοιπα της ουράς της FtsZ σχηματίζουν μια περιοχή που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες όπως είναι η FtsA, ZipA, MinC/MinD, SlnA και ZapD (Pichoff et al., 2015; Shen and Lutkenhaus, 2009; Szwedziak et al., 2012). Η PpiC πιθανώς συνδέεται με την FtsZ με παρόμοιο τρόπο σύνδεσης με τις γνωστές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την FtsZ και ανταγωνίζεται με αυτές τη δέσμευσή της στην FtsZ κατά την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς αποτρέπει το σχηματισμό του Z-δακτυλίου όταν απαιτείται. Επίσης, αν και η ήπια έκφραση της ZipA είναι γνωστό ότι δεν παρεμβαίνει στην κυτταρική διαίρεση (Hale et al., 1997), η υπερέκφραση προκαλεί επιμηκυσμένα κύτταρα αναστέλλοντας τη διαίρεση (Cabr e et al., 2013). Η υπερέκφραση της ZipA προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων και κατά την στατική φάση ανάπτυξης, ενώ τα κύτταρα απουσία PpiC έχουν διαιρεθεί φυσιολογικά. Η απουσία της PpiC φαίνεται να σταθεροποιεί καλύτερα την ενδοκυτταρική τοποθέτηση της ZipA στα διάσπαρτα σημεία κατά μήκος της περιφέρειας των κυττάρων, καθώς και στους κυτταρικούς πόλους, ενώ επίσης διαπιστώθηκε ότι η παρβουλίνη σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο αλληλεπίδρασης με την ZipA. Ακόμα, η υπερέκφραση της FtsK κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας μετρίου μεγέθους κύτταρα, ενώ η υπερέκφρασή της στο *ΔrpiC* στέλεχος έχει ως αποτέλεσμα τη φυσιολογική κυτταρική μορφολογία. Η επιμήκυνση των κυττάρων που παρατηρείται από

την υπερέκφραση της PpiC μπορεί να συμβαίνει μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ZipA και την FtsZ, πιθανώς μεταβάλλοντας τις ιδιότητες τους, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αποτελεσματική αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες που ακολουθούν για τον σωστό σχηματισμό του Z-δακτυλίου. Βέβαια απαιτείται περισσότερη μελέτη ώστε να διευκρινιστεί ακριβώς η δράση της PpiC ως ρυθμιστής της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς και ως ρυθμιστής της αλληλεπίδρασης με την ZipA και την FtsZ, ενώ πρέπει να διευκρινιστεί η πιθανή ρύθμιση της FtsK, πρωτεΐνη υπεύθυνη για την ολοκλήρωση της κυττοκίνησης.

Η κυκλοφιλίνη PpiB φαίνεται ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία της ZipA. Στην ομαδική κίνηση, το στέλεχος *ΔppiB(zipA)* προκαλεί περισσότερα επιμηκυσμένα κύτταρα από ότι το στέλεχος BW25113(*zipA*), όπου τα κύτταρα εμφανίζονται επιμηκυσμένα σε μικρότερη συχνότητα. Από την διερεύνηση του ρόλου της PpiB στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των FtsZ και ZipA προκύπτει ότι εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική τους τοποθέτηση. Η υπερέκφραση της FtsZ προκαλεί αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και τοποθέτησή της στα διαφράγματα με τη μορφή δακτυλίου. Η υπερέκφραση απουσία της κυκλοφιλίνης δεν παρουσίασε καμία αλλαγή, αντίθετα όταν συνεκφράστηκε και η PpiB στα κύτταρα αναστάληκε η ικανότητα συγκρότησης λειτουργικού Z-δακτυλίου, αφού η FtsZ δεν εντοπίστηκε σε πιθανές θέσεις διαίρεσης, αλλά διάχυτη στο κυτταρόπλασμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κρισιμότητα που φαίνεται να διαδραματίζει η ενεργότητα PPIάσης της κυκλοφιλίνης στην αναστολή της συγκρότησης Z-δακτυλίου, αφού η συνέκφραση των PpiB<sub>F99A</sub> και PpiB<sub>R43A</sub> με την FtsZ, επανέφερε την ορθή ενδοκυτταρική τοποθέτηση της FtsZ σε Z-δακτυλίους. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν για την ενδοκυτταρική τοποθέτηση της ZipA, αφού και σε αυτήν την περίπτωση η παρουσία της PpiB, άρα και η ενεργότητα PPIάσης της, φαίνεται ότι παρεμποδίζει την τοποθέτηση της ZipA σε διάσπαρτα σημεία κατά μήκος της περιφέρειας των κυττάρων, καθώς και στους κυτταρικούς πόλους.

Διαπιστώθηκε ότι *in vivo* η PpiB σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο αλληλεπίδρασης με την FtsZ και την ZipA, ενώ αλληλεπίδραση παρουσιάστηκε και με την FtsK. Επίσης, η PpiB αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά και με την αποδιατεταγμένη FtsZ, ενώ για αυτήν την αλληλεπίδραση δεν ευθύνεται αποκλειστικά το ενεργό κέντρο PPIάσης της PpiB, αφού η FtsZ συνεκλούστηκε μαζί με τις μεταλλαγμένες κυκλοφιλίνες ως σταθερό σύμπλοκο πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης. Όμως, πιθανώς συμμετέχει και αυτό με κάποιον τρόπο, ίσως στην αναγνώριση, αφού προσθήκη της FtsZ προκαλεί μείωση της ενεργότητας PPIάσης της PpiB. Επιπλέον, φαίνεται ότι για την αποτελεσματική αναγνώριση και αλληλεπίδραση μεταξύ τους εμπλέκεται το C-τελικό άκρο της FtsZ, αφού απαλοιφή του είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της αλληλεπίδρασης. Η PpiB πιθανώς συνδέεται με την FtsZ με παρόμοιο τρόπο σύνδεσης με τις γνωστές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την FtsZ και ανταγωνίζεται με αυτές τη δέσμευσή της στην FtsZ κατά την κυτταρική διαίρεση και συνεπώς αποτρέπει το σχηματισμό του Z-δακτυλίου όταν απαιτείται. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκαταλέγοντας και το γεγονός ότι η ενεργότητα GTPάσης της FtsZ παρουσία της PpiB μειώνεται, υποδεικνύουν ότι η κυκλοφιλίνη δρα πιθανώς ως αποσταθεροποιητής των πολυμερών της FtsZ. Η αρνητική επίδραση της κυκλοφιλίνης στην συναρμολόγηση του Z-δακτυλίου επιβεβαιώνεται και από την αλλαγή της ενδοκυτταρικής τοποθέτησης της ZipA.

Επιπλέον, εξετάστηκε εάν η αρνητική επίδραση της κυκλοφιλίνης στην συναρμολόγηση του Z-δακτυλίου επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης αναστολέων της κυτταρικής διαίρεσης. Το σύστημα Min αποτρέπει τη διάταξη του Z-δακτυλίου κοντά στους πόλους του κυττάρου μέσω της χωρικής ρύθμισης της FtsZ από την MinC. *In vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι η MinC ανταγωνίζεται τη συναρμολόγηση της FtsZ χωρίς να επηρεάζει τη GTPάση της. Βιοχημικές και γενετικές μελέτες έδειξαν ότι η MinC είναι ένα διμερές με κάθε μονομερές της να αποτελείται από δύο λειτουργικές περιοχές. Το

N-τελικό άκρο της, είναι υπεύθυνο για την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης σε βιολογικό περιβάλλον και ανταγωνίζεται το πολυμερισμό της FtsZ *in vitro*. Το C-τελικό της άκρο είναι υπεύθυνο για το διμερισμό και την αλληλεπίδραση με την MinD (Lutkenhaus, 2007). Τέλος, η SulA καταστέλλει την κυτταρική διαίρεση, αλληλεπιδρώντας με την FtsZ. Η SulA εκφράζεται όταν ενεργοποιείται η απόκριση SOS, ένας μηχανισμός για την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και την επιδιόρθωση του DNA σε περίπτωση βλάβης του. Η SulA δεσμεύει την επιφάνεια του βρόχου T7 της FtsZ, απέναντι από τη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου, εμποδίζοντας το σχηματισμό πολυμερούς (Cordell et al., 2003).

Η κυκλοφιλίνη PpiB φαίνεται ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία της SulA και της MinC. Η υπερέκφραση της SulA κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων λόγω αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης (Huisman et al., 1984) όμως κατά την στατική φάση ανάπτυξης αλλά και την ομαδική κίνηση τα κύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική κυτταρική μορφολογία, αντίθετα στο απουσία της PpiB τα κύτταρα παραμένουν επιμηκυσμένα. Επίσης, η υπερέκφραση της MinC κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης προκαλεί το σχηματισμό επιμηκυσμένων κυττάρων (Shen and Lutkenhaus, 2009). Κατά την ομαδική κίνηση το στέλεχος *ΔppiB(minC)* προκαλεί πιο επιμηκυσμένα κύτταρα σε σχέση με το στέλεχος BW25113(*minC*). Από την διερεύνηση του ρόλου της PpiB στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των παραπάνω πρωτεϊνών, προκύπτει ότι δρα προστατευτικά για την MinC. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MinC αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας επιμηκυσμένα κύτταρα, που φέρουν μεγάλα έγκλειστα σωμάτια λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Η συνέκφραση της PpiB στα κύτταρα λειτούργησε προστατευτικά, βοηθώντας στην ορθή αναδίπλωση της MinC, ενώ σε αυτόν τον μηχανισμό της κυκλοφιλίνης φαίνεται ότι δεν απαιτείται η ενεργότητα PPIάσης της κυκλοφιλίνης αλλά ίσως η ενεργότητα τσαπερόνης της. Η υπερέκφραση της SulA όπως και της MinC παρουσιάζει πιο σοβαρές επιπτώσεις στην κυτταρική διαίρεση των κυττάρων του στελέχους *ΔppiB* στην ομαδική κίνηση υποδηλώνοντας ότι η PpiB δρα προστατευτικά για το Z-δακτύλιο έναντι της αρνητικής επίδρασης αυτών των αναστολέων ή εναλλακτικά θα μπορούσε να λειτουργήσει ως αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργία τους.

Συμπεραίνεται ότι η PpiB πιθανώς δρα μετά-μεταφραστικά στις FtsZ και ZipA, μεταβάλλοντας τις ιδιότητες τους, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αποτελεσματική αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες που ακολουθούν για τον σωστό σχηματισμό του Z-δακτυλίου. Επίσης, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, όπως της ομαδικής κίνησης, φαίνεται ότι η PpiB πιθανώς λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας των αναστολέων της κυτταρικής διαίρεσης, SulA και MinC. Η αναστολή του σχηματισμού διαφράγματος μέσω της ρύθμισης του πολυμερισμού της FtsZ, αντιπροσωπεύει ένα κοινό μηχανισμό που είναι συντηρημένος μεταξύ των βακτηρίων για τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης και της δραστηριότητας του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση σε διάφορες συνθήκες (Adams and Errington, 2009).

Η PpiB θα μπορούσε να παρεμβαίνει στην κυτταρική διαίρεση και μέσω πιο πλάγιας οδού. Η ίδια η PpiB δεν αποτελεί πρωτεΐνη που λαμβάνει μέρος στη συγκρότηση του Z-δακτυλίου, ως εκ τούτου, προκειμένου να διευκρινιστεί ακριβέστερα η λειτουργία της PpiB θεωρήθηκε ότι η επίδραση της PpiB στην κυτταρική διαίρεση θα μπορούσε πιθανόν να επιτευχθεί μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται αποκλειστικά με την κυτταρική διαίρεση. Έτσι, εξετάστηκε εάν οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης που παρέχονται από τις βάσεις δεδομένων, θα μπορούσαν να καταστειλλουν τη κυτταρική μορφολογία του στελέχους *ΔppiB* κατά την ομαδική κίνηση και κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Η υπερέκφραση των Pta, YdcS, GlpD και YhjU κατά την ομαδική κίνηση χαρακτηρίζεται από μικρότερα κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα του στελέχους *ΔppiB* και ο μηχανισμός της κυτταρικής



διαίρεσης λειτουργεί καλύτερα, ενώ το *ΔrriB* στέλεχος που υπερεκφράζει την YfbU παρουσιάζει κυτταρική μορφολογία παρόμοια με αυτήν του στελέχους αγρίου τύπου. Επίσης, τα στελέχη *ΔyfbU* και *ΔyhjU* παρουσιάζουν παρόμοια κυτταρική μορφολογία με αυτήν του στελέχους *ΔrriB* κατά την ομαδική κίνηση, υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεΐνες YfbU και YhjU εμπλέκονται στο μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης. Επίσης, κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης η υπερέκφραση των YdcS, YfbU, YhjU και HcaB χαρακτηρίζεται από μικρότερα κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα του στελέχους *ΔrriB*. Τα κύτταρα του στελέχους *ΔydcS* και σε μικρότερο βαθμό τα κύτταρα του στελέχους *ΔyfbU* παρουσίασαν σημαντική φαινοτυπική ομοιότητα με τα κύτταρα του στελέχους *ΔrriB* υποδεικνύοντας ότι εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης. Απομένει να καθοριστεί εάν αυτές οι πρωτεΐνες είναι άμεσοι στόχοι της Prib στο μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παρβουλίνη Prib και η κυκλοφιλίνη Prib παρεμβαίνουν στη κυτταρική διαίρεση στο *E. coli*, μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση. Επιπλέον, η κυκλοφιλίνη φαίνεται να επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση και με την έμμεση ρύθμιση άλλων οδών. Σαφώς, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης τους.

#### **Δ.5 Βιοχημικός χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων κλώνων των *rriB* και *rriA* γονιδίων στο βακτήριο *E. coli***

Στα πλαίσια ερευνητικής μελέτης του εργαστηρίου ώστε να εντοπιστούν οι δομικές περιοχές των κυκλοφιλινών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την *in vivo* δράση τους στην ομαδική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου τα γονίδια των κυκλοφιλινών μεταλλάχθηκαν τυχαία μέσω της τεχνικής «error prone PCR». Τα *ΔrriB* και *ΔrriA* στελέχη μετασχηματίστηκαν με τη βιβλιοθήκη των μεταλλαγμένων *rriB* και *rriA* κλώνων και αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ομαδικής κίνησης και βιοϋμενίου αντίστοιχα. Οι κλώνοι που προέκυψαν εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί εάν διαθέτουν ενεργότητα PPIάσης και ενεργότητα τσαπερόνης και να συγκριθεί με αυτήν που διαθέτουν τα στελέχη των κυκλοφιλινών Prib και PribA αγρίου τύπου.

Η κυτταροπλασματική Prib, όπως και άλλες PPIάσες μονής περιοχής (Barik, 2006; Dimou et al., 2011), εκτός από την ενεργότητα PPIάσης διαθέτει επίσης και λειτουργία τσαπερόνης. Αρκετοί κλώνοι βρέθηκε ότι παρουσιάζουν μειωμένη ενεργότητα PPIάσης και έφεραν μεταλλάξεις που βρίσκονταν σε αμινοξέα που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην ενδομετατροπή του ενζύμου μεταξύ δύο διαμορφώσεων όπου δεσμεύονται τα *cis*- και *trans*- υποστρώματα όπως το αμινοξύ M49. Επίσης, έφεραν μεταλλάξεις σε αμινοξέα που βρίσκονταν στον L1-βρόγχο του ενζύμου, όπως τα αμινοξέα Q61 και G53, οι οποίες προκαλούν μείωση της ενεργότητας PPIάσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενδεχομένως επειδή επηρεάζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του L1-βρόχου και του πεπτιδικού υποστρώματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κλώνοι οι οποίοι μειώνουν την ενεργότητα τσαπερόνης φαίνεται να μην επηρεάζουν την ενεργότητα PPIάσης του ενζύμου. Βέβαια αν και τα ακριβή δομικά χαρακτηριστικά της Prib που είναι υπεύθυνα για τη λειτουργία τσαπερόνης παραμένουν ασαφή, η δομική σταθερότητα μπορεί να είναι σημαντική δεδομένου ότι κλώνοι που φέρουν μεταλλάξεις σε υπολείμματα αμινοξέων εκτός του ενεργού κέντρου PPIάσης, όπως στα G53 και W118, προκαλούν μείωση της ενεργότητας τσαπερόνης της Prib. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι δύο λειτουργίες θα μπορούσαν να διαχωριστούν.

Για την περιπλαστική κυκλοφιλίνη PpiA διαπιστώθηκε ότι οι β-πτυχωτές επιφάνειες της πρωτεΐνης είναι σημαντικές για τη διατήρηση της ενεργότητας PPIάσης της όπως επίσης σημαντικό φαίνεται να είναι και το αμινοξύ F149 στον L3-βρόγχο αφού μετάλλαξή του προκαλεί μείωση της ενεργότητας PPIάσης του ενζύμου.

#### Δ.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνών στόχων της PpiB στην κινητικότητα και στο σχηματισμό βιοϋμενίου

Η λειτουργία των PPIάσων, στοχεύει στην αναδίπλωση ορισμένων πρωτεϊνών στόχων με σκοπό να τις καταστήσουν λειτουργικές και να τις ενεργοποιήσουν είτε να ρυθμίζουν τη δράση τους λειτουργώντας ως μοριακοί διακόπτες, ώστε αυτές να επιτελέσουν το βιολογικό τους ρόλο. Η κυκλοφιλίνη PpiB, φαίνεται ότι δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης όπως και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στο βακτήριο *E.coli*. Στην προσπάθεια αποσαφήνισης του τρόπου δράσης της κυκλοφιλίνης σε αυτές τις συνθήκες, εξετάστηκε η υπόθεση οι επιπτώσεις λόγω της έλλειψης της PpiB που παρατηρούνται στο βακτήριο *E.coli*, να επιτυγχάνονται μέσω των αλληλεπιδράσεων της κυκλοφιλίνης με πρωτεΐνες στόχους οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση των μελετούμενων συνθηκών. Όπως επίσης και μέσω της μετά-μεταφραστικής ρύθμισης των λειτουργιών ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών από την PpiB.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αναζήτηση των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της κυκλοφιλίνης, μέσω της βάσης δεδομένων IntAct. Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίστηκαν μετά από την υπερέκφραση του γονιδίου *ppiB<sub>His</sub>* (His-6 επίτοπο) στο *E. coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλόκων της PpiB<sub>His</sub> με αυτές, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Τα σύμπλοκα αναλύθηκαν, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες συνεκλούνται από την στήλη Ni-NTA αгарόζης ταυτόχρονα με την PpiB<sub>His</sub> και έπειτα προσδιορίστηκε μερικώς η αλληλουχία των αμινοξέων τους (Arifuzzaman et al., 2006). Έτσι αφού εντοπίστηκαν οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι της κυκλοφιλίνης, εξετάστηκε εάν η υπερέκφρασή τους μπορεί να επιφέρει καταστολή των φαινοτύπων που παρουσιάζει το *ΔppiB* στέλεχος, κατά την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και το σχηματισμό βιοϋμενίου.

Διαπιστώθηκε ότι το σύνολο των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν, μπορούν να καταστείλουν την ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης όσο και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔppiB*. Μάλιστα, αρκετές από αυτές παρουσίασαν μεγάλη εξειδίκευση επαναφέροντας το φαινότυπο του αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔppiB* μόνο υπό συγκεκριμένη συνθήκη, ενώ οι Bgal, Pta, DadA και LpxH, δεν επαναφέρον το φαινότυπο του αγρίου τύπου για καμία από τις τρεις συνθήκες εξέτασης. Στην περίπτωση που μια αντίδραση ισομερισμού της πιθανής πρωτεΐνης στόχου είναι απαραίτητη, η αφθονία της πρωτεΐνης λόγω υπερέκφρασής της σε συνδυασμό με την αργή μη καταλυόμενη ισομερείωση, θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγεί επαρκώς την παρατηρούμενη συμπληρωματικότητα στο *ΔppiB* στέλεχος. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να αναγνωρίζονται επιλεκτικά ή μη και από άλλες PPIάσες του κυττάρου, λαμβάνοντας υπόψη και την παρατηρούμενη λειτουργική συμπληρωματικότητα μεταξύ των μελών της οικογένειας των PPIάσων.

Έχουν εντοπιστεί παραδείγματα λειτουργικής υποκατάστασης σε μεταλλαγμένα στελέχη PPIάσης από άλλες πρωτεΐνες, όπως ότι *in vivo* η απώλεια της TF αντισταθμίζεται από την επαγωγή των μηχανισμών απόκρισης στο θερμικό σοκ και έτσι από τα αυξημένα επίπεδα της DnaK ενώ η συν-λειτουργία των δύο μηχανιστικά διακριτών συνοδών βασίζεται στην επικάλυψη των ειδικών υποστρωμάτων τους (Deuerling et al., 2003). Εξάλλου, έχει εκτιμηθεί ότι το 37% των ενζύμων του *E. coli* αναγνωρίζουν μια ποικιλία υποστρωμάτων και καταλύουν το 65% των γνωστών μεταβολικών αντιδράσεων (Nam et al., 2012). Επίσης, εντοπίστηκαν 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, όπου τα γονίδια αυτά δεν είχαν ουδεμία συγγένεια, είτε μεταξύ τους, είτε με το γονίδιο το οποίο είχε απενεργοποιηθεί (Patrick et al., 2007). Ενώ, έχει βρεθεί ότι η επαναφορά του θερμοευαίσθητου φαινότυπου (*essI<sup>ts</sup>*) της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος οφείλεται στην απαλοιφή του γονιδίου *essI*, λόγω της υπερέκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη Sap30. Η Sap30 φαίνεται ότι αλληλεπιδρά τόσο με την παρβουλίνη Ess1 όσο και με την κυκλοφιλίνη A Cpr1 (Wu et al., 2000; Arévalo-Rodríguez et al., 2000).

Στην συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος της κάθε πρωτεΐνης στόχου της PpiB στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Έτσι, μελετήθηκαν στις παραπάνω συνθήκες τα στελέχη τα οποία φέρουν απαλοιφή του κάθε γονιδίου που κωδικοποιεί για τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους της κυκλοφιλίνης. Διαπιστώθηκε ότι πολλά από τα στελέχη που μελετήθηκαν παρουσιάζουν παρόμοιους φαινότυπους με αυτούς του στελέχους *ΔppiB* κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και το σχηματισμό βιοϋμενίου, υποδηλώνοντας ότι εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες. Επίσης, οι φαινότυποι που παρουσιάζουν τα μεταλλαγμένα στελέχη κάθε πρωτεΐνης-στόχου συμπίπτουν με τους φαινότυπους που παρατηρήθηκαν όσον αφορά τη συμπληρωματικότητα στο *ΔppiB* στέλεχος. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι PflB και HcaB στην ομαδική κίνηση, FucK, MukB, ClpX, YfiE στο σχηματισμό βιοϋμενίου, HflK, PutA, RhsC στην κολυμβητική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου και η YdcS στην ομαδική κίνηση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι οι πιθανές πρωτεΐνες στόχοι που όταν απαλοφεί το γονίδιο που τις κωδικοποιεί παρουσιάζουν κοινούς φαινότυπους με το *ΔppiB* στέλεχος, θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε παρόμοιες ή παράλληλες οδούς με την κυκλοφιλίνη και έτσι η υπερέκφρασή τους θα ήταν ικανή να αποκαταστήσει το φαινότυπο του *ΔppiB* στελέχους. Εναλλακτικά, αυτές θα μπορούσαν να δρουν στην ίδια ρυθμιστική οδό με την κυκλοφιλίνη και να αποτελούν υποστρώματά της εκδοχή που χρειάζεται περαιτέρω εξέταση, όμως μπορεί να λειτουργήσει ως ένδειξη για πιθανές αλληλεπιδράσεις.

## Δ.7 Ο βιολογικός ρόλος των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών του *E. coli*

Η αναγνώριση και η ταυτοποίηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο μιας πρωτεΐνης αλλά και να συμβάλλει στην επαρκέστερη κατανόηση των πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών. Οι ΡΡΙΑσες λόγω της φύσης της λειτουργίας που επιτελούν είναι ιδιαίτερα πιθανό να αλληλεπιδρούν με πληθώρα πρωτεϊνών και έτσι να εμπλέκονται σε διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες. Η αλληλεπίδραση των FKBP's με πρωτεΐνες στόχους φαίνεται να είναι παροδική (Ingelfinger et al., 2003; Jacob et al., 2009). Όμως έχουν υπάρξει και παραδείγματα σταθερής αλληλεπίδρασης όπως της παρβουλίνης Pin1 με πρωτεΐνες στόχους (Finn and Lu, 2008), ωστόσο η σταθερότητα των συμπλόκων που σχηματίζει οφείλεται στην επιπρόσθετη WW περιοχή που φέρει στην οποία προσδένονται, αν όχι όλες, οι περισσότερες πρωτεΐνες στόχοι (Liu et al., 2011). Επίσης, σταθερά σύμπλοκα με την πρωτεΐνη Ras σχηματίζει η FKBP12, καθώς ισομεριώνει την προλίνη 175 της (Liu et al., 2011).

Αρχικά, όπως αναφέρθηκε αναζητήθηκαν πιθανές πρωτεΐνες στόχοι των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών, μέσω της βάσης δεδομένων IntAct (για την κυκλοφιλίνη PpiA δεν βρέθηκε καμία πιθανή πρωτεΐνη στόχος). Στην συνέχεια, εξετάστηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των παρβουλινών και των κυκλοφιλινών με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους διερευνώντας το σχηματισμό σταθερών συμπλόκων *in vivo* μεταξύ της κάθε ΡΡΙΑσης και της κάθε πρωτεΐνης στόχου. Διαπιστώθηκε η PpiC με την MukB

φαίνεται να σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο αλληλεπίδρασης. Η αλληλεπίδραση της MukB με την παρβουλίνη επιβεβαιώθηκε και με overlay αποτύπωση κατά Western (Far-Western Blot). Η πρωτεΐνη MukB είναι μια DNA-δεσμευόμενη πρωτεΐνη με ενεργότητα ATPάσης, που εμπλέκεται στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και το διαχωρισμό τους και δρα σε σύμπλοκο με τις MukEF (Rybenkov et al., 2014). Έχει εντοπιστεί στο πυρηνοειδές και έχει βρεθεί ότι το N-τελικό τμήμα της, αλληλεπιδρά με την FtsZ (Lockhart and Kendrick-Jones, 1998) όμως δεν εντοπίστηκε στο Z-δακτύλιο (Blaauwen et al., 2001). Ωστόσο, έχει προταθεί ότι ίσως η MukB προλαμβάνει τον πρόωρο πολυμερισμό της FtsZ στην περιοχή της διαίρεσης, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στο φαινόμενο της απόφραξης του πυρηνοειδούς (*nucleoid occlusion*) (Blaauwen et al., 2001). Αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύει την εμπλοκή της παρβουλίνης PpiC στην κυτταρική διαίρεση, υπογραμμίζοντας την ανάγκη περεταίρω διερεύνησης του ρόλου που επιτελεί σε αυτήν. Η αδυναμία εντοπισμού περισσότερων συμπλόκων αλληλεπίδρασης μεταξύ των PPIάσων και των πιθανών πρωτεϊνών στόχων, πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη παροδικών αλληλεπιδράσεων τους με αυτές τις πρωτεΐνες στόχους (*transient interaction*) ή στην προτίμηση των PPIάσων για πλήρως ή μερικώς μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στόχους.

Η κυκλοφιλίνη PpiB φαίνεται ότι εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες αφού βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με αρκετές πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους στα κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες στόχους εντοπίστηκαν με τη χρήση διαφορετικών μεθόδων εντοπισμού πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Αρχικά, με χρωματογραφία συγγενείας διαπιστώθηκε ότι η κυκλοφιλίνη σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα αλληλεπίδρασης με τις DnaK, Pta, PflB. Θεωρώντας ότι για μια αποτελεσματική λειτουργία στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών οι PPIάσες θα πρέπει να δείχνουν υψηλή συγγένεια σε μη ή ενδιάμεσα-διπλωμένες πρωτεΐνες και χαμηλή ή καθόλου συγγένεια για πλήρως διπλωμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε φυσική (native) κατάσταση (Schmidpeter and Schmid, 2015), ελέγξαμε τις αλληλεπιδράσεις της κυκλοφιλίνης με τις πρωτεΐνες στόχους όταν αυτές έχουν αποδιαταχθεί. Έτσι εντοπίστηκε η αλληλεπίδραση της PpiB με την αποδιαταγμένη AccC, η οποία επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο split-GFP, αλλά διαπιστώθηκε ότι η DnaK πρέπει να βρίσκεται σε φυσική κατάσταση για να αλληλεπιδράσει με την PpiB. Επιπλέον, με τη μέθοδο της overlay αποτύπωσης κατά Western επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης με τις Pta και PflB αλλά εντοπίστηκαν και τρεις ακόμα πρωτεΐνες στόχοι που αλληλεπιδρούν με την PpiB οι: HflK, FtsH και MukB. Επίσης, οι GIpD, ClpX, R114, DadA πιθανώς δρουν ως πρωτεΐνες στόχοι της PpiB αφού η παρουσία τους μειώνει την μετρούμενη ενεργότητα PPIάσης της PpiB υποδεικνύοντας έναν πιθανό ανταγωνισμό των πιθανών πρωτεϊνών στόχων με το υπόστρωμα της αντίδρασης για δέσμευσή τους στο ενεργό κέντρο PPIάσης της PpiB.

Η PpiB φαίνεται ότι εμπλέκεται στο μονοπάτι μετατροπής του πυροσταφυλικού και του CoA σε ακετυλο-CoA και μυρμηκικό μέσω της αλληλεπίδρασης της με την PflB (C-ακετυλομεταφοράση του μυρμηκικού), το οποίο έχει έναν κεντρικό ρόλο στην αναερόβια ζύμωση της γλυκόζης από τα κύτταρα του *E. coli*. Επίσης, οι πηγές άνθρακα που μεταβολίζονται σε ακετυλο-CoA, ακετυλο-φοσφορικό και οξικό ευνοούν το σχηματισμό του βιοϋμενίου. Ο μεταβολισμός του οξικού λειτουργεί ως μεταβολικός αισθητήρας, μεταδίδοντας τις αλλαγές στις περιβαλλοντολογικές συνθήκες, στη βιομάζα του βιοϋμενίου (Prüss et al., 2010). Η PflB βρέθηκε ότι δεν μπορεί να επαναφέρει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔppiB*, υποδεικνύοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα ακετυλο-CoA προωθούν το σχηματισμό βιοϋμενίου. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι στην αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης με την PflB πιθανώς συμμετέχει το ενεργό κέντρο της PpiB, αφού μειώνεται η ενεργότητα PPIάσης της παρουσία της PflB και φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ενώ η προλίνη P370 της PflB που διατηρεί την *cis* διαμόρφωση φαίνεται ότι δεν αποτελεί στόχο

αναγνώρισης από τη PpiB. Η κυκλοφιλίνη συνδέεται με το μεταβολισμό του οξικού και μέσω της Pta. Η φωσφορική ακετυλομεταφοράση (pta) καταλύει την αναστρέψιμη μετατροπή μεταξύ του ακέτυλο-CoA και του ακετυλοφωσφορικού, ένα στάδιο στο μεταβολισμό του οξικού. Βιβλιογραφικά έχει εντοπιστεί η αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης AnPpiB, του *A. vinelandii* και με τις δύο ισομορφές της αντίστοιχης Pta (Dimou et al., 2012a). Αν και η Pta δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση στην ενεργότητα PPIάσης της PpiB, φαίνεται ότι στην αλληλεπίδραση μεταξύ της PpiB και της Pta πιθανώς συμμετέχει το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης με κάποιον τρόπο, αφού η ενεργότητα της PpiB όσο και η προλίνη στη θέση 678 της Pta, είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση μεταξύ τους και τη σωστή διαμόρφωση της Pta. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι παρουσία της κυκλοφιλίνης αυξάνεται η ενεργότητα της Pta υποδεικνύοντας ότι η PpiB πιθανώς εμπλέκεται στη ρύθμιση του συστήματος αφομοίωσης του οξικού.

Η συμμετοχή της κυκλοφιλίνης στη ρύθμιση των επιπέδων του ακέτυλο-CoA, ισχυροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης της με την AccC. Η καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA καταλύει τη μετατροπή του ακέτυλο-CoA σε μηλότυλο-CoA, εξυπηρετώντας πολλές λειτουργίες, ενώ παρέχει και το δομικό συστατικό για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Tong, 2013). Σε αυτήν την αλληλεπίδραση φαίνεται ότι συμμετέχει το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης, αφού μειώνεται η ενεργότητα PPIάσης της PpiB παρουσία της AccC, όμως η προλίνη P244 της AccC πιθανώς δεν αποτελεί στόχο αναγνώρισης από τη PpiB. Επίσης, η αλληλεπίδραση της AccC με την PpiB κρίνεται αναγκαία για τη διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης της AccC. Σε αυτή την κατεύθυνση συνηγορεί και η παρατήρηση των κυττάρων, όπου η υπερέκφραση της AccC απουσία της κυκλοφιλίνης προκαλεί έγκλειστα σωμάτια λόγω λάθος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, ενώ παρουσία της η AccC εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας ότι η κυκλοφιλίνη λειτουργεί προστατευτικά, βοηθώντας στην ορθή αναδίπλωση της AccC. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρουσία της κυκλοφιλίνης αυξάνεται η ενεργότητα της AccC επιβεβαιώνοντας ότι η PpiB πιθανώς εμπλέκεται στη ρύθμιση της δραστηριότητας καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA. Επιπλέον, η κυκλοφιλίνη AnPpiB έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την AccC του *A. vinelandii* (Dimou et al., 2012b). Επίσης, η υπερέκφραση της AccC, επαναφέρει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και την ικανότητα ομαδικής κίνησης στα επίπεδα του αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔppiB*, υποδεικνύοντας μια πιθανή αποκατάσταση των επιπέδων του ακέτυλο-CoA και πιθανώς της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων. Βέβαια ο ακριβής τρόπος αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και η πιθανή εμπλοκή της κυκλοφιλίνης στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων μένει να διευκρινιστεί.

Επίσης, η κυκλοφιλίνη φαίνεται ότι εμπλέκεται στο δίκτυο πρωτεασών FtsH/HflKC, αφού αλληλεπιδρά τόσο με την FtsH, όσο και με την HflK. Η FtsH είναι μια ATPάση δεσμευμένη στη μεμβράνη, που έχει προταθεί ότι συμμετέχει στη συναρμολόγηση μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς και στην υποβάθμιση κάποιων ασταθών πρωτεϊνών. Η HflK σε σύμπλοκο με την HflC ρυθμίζουν αρνητικά την πρωτεολυτική ενεργότητα της FtsH (Kihara et al., 1996). Επίσης, η FtsH είναι υπεύθυνη για την *in vivo* αποικοδόμηση της πρωτεΐνης SecY, υπομονάδα του μεταθέτη SecYEG, όταν αυτή αποτυγχάνει να συνδεθεί με την πρωτεΐνη SecE (Akiyama et al., 1996). Με την πρωτεΐνη SecY έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά και η παρβουλίνη PpiD (Sachelaru et al., 2014). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αλληλεπίδραση της κυκλοφιλίνης με την MukB που προλαμβάνει τον πρόωρο πολυμερισμό της FtsZ στην περιοχή της διαίρεσης, με τον οποίο όπως αναφέρθηκε πιθανώς εμπλέκεται και η PpiB.

Η DnaK είναι μια Hsp70 (θερμικού σοκ) συνοδός του *E. coli* η οποία εμπλέκεται σε έναν αριθμό κυτταροπλασματικών κυτταρικών διεργασιών όπως η *de novo* αναδίπλωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Deuerling et al., 1999) και η διάσωση των λάθος διπλωμένων πρωτεϊνών (Schröder et al., 1993). Η δράση της τροφοδοτείται από την υδρόλυση του ATP και επικουρείται από συν-συνοδούς πρωτεΐνες όπως η DnaJ και η GrpE. Η DnaK συμβάλλει στον έλεγχο της απόκρισης σε θερμικό σοκ στο

*E. coli* μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον παράγοντα  $\sigma^{32}$ , ο οποίος είναι ο πρωταρχικός σίγμα παράγοντας για τον έλεγχο της απόκρισης σε θερμικό σοκ (Yura and Nakahigashi, 1999). Η Prib αλληλεπιδρά όπως αναφέρθηκε με την DnaK και η παρουσία της μειώνει την ενεργότητα PPIάσης της Prib, πιθανώς όμως να μην εμπλέκεται το ενεργό κέντρο της κυκλοφιλίνης αφού η μεταλλαγμένη Prib<sub>F99A</sub> συνεχίζει να αλληλεπιδρά με την DnaK. Παρουσία της κυκλοφιλίνης αυξάνεται η ενεργότητα της DnaK, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι η ενεργότητα ATPάσης της DnaK αυξήθηκε περισσότερο παρουσία της Prib και της DnaJ, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς η Prib να δρα ως υπόστρωμα της DnaK. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι η εγγενώς χαμηλή ενεργότητα ATPάσης της DnaK, αυξάνεται από πρωτεΐνες που δρουν ως υποστρώματά της, σε συνεργία με τον j-τομέα συν-συνοδών πρωτεϊνών (co-chaperones proteins) (Karzai and McMacken, 1996, Laufel et al., 1999). Στην προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ της Prib και της DnaK ελέγχθηκε η εμπλοκή της Prib στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση της DnaK και φαίνεται ότι η κυκλοφιλίνη απαιτείται για τη σωστή ενδοκυτταρική τοποθέτηση της DnaK. Η DnaK έχει συσχετιστεί με τις PPIάσες αφού φαίνεται ότι δρα συναιτεριστικά με την TF στο δίπλωμα των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (Deuerling et al., 1999), ενώ έχει βρεθεί ότι η AvPrib, του *A. vinelandii*, αλληλεπιδρά με την DnaK, χωρίς να είναι απαραίτητη η ενεργότητα PPIάσης της κυκλοφιλίνης για αυτήν την αλληλεπίδραση (Dimou et al., 2011). Ο ακριβής τρόπος αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών και το μονοπάτι δράσης που εμπλέκεται η κυκλοφιλίνη μένει να προσδιοριστεί.

Πιθανή είναι και η εμπλοκή της κυκλοφιλίνης στη βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης της με την GlpD αφού η 3-φωσφορική γλυκερόλη αποτελεί υποχρεωτικό ενδιάμεσο αυτής. Ακόμα, είναι πιθανή η συμμετοχή της στο μονοπάτι αποικοδόμησης I της L-αλανίνης μέσω της αλληλεπίδρασής με την DadA όπως και πιθανή συμμετοχή της στο σύμπλοκο του ριβοσώματος μέσω της αλληλεπίδρασής με την R114 (συστατικό της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος). Εξάλλου υπάρχουν αναφορές για συμμετοχή PPIασών στο σύμπλοκο του ριβοσώματος, όπως της πρωτεΐνης TF που προσδένεται στο σημείο διόδου ή εξόδου των πεπτιδίων του ριβοσώματος μέσω της αλληλεπίδρασης με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L23 και L29 και δρα ως η πρώτη τσαπερόνη (Kramer et al., 2002).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι τόσο η κυκλοφιλίνη Prib όσο και η παρβουλίνη PribC πιθανώς συμμετέχουν σε πολλές και διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες. Η περαιτέρω μελέτη των παραπάνω πιθανών αλληλεπιδράσεων αλλά και η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των υπόλοιπων μελών των PPIασών με πιθανές πρωτεΐνες στόχους, μπορεί να επεκταθεί και να συμπεριλάβει νέες *in vitro* και *in vivo* πειραματικές προσεγγίσεις οι οποίες θα βοήθησουν στην αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης αυτών των αλληλεπιδράσεων και του τρόπου συμμετοχής των PPIασών σε αυτές.

## **Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**





**E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Aarsman M.E., Piette A., Fraipont C., Vinkenvleugel T.M., Nguyen-Disteche M., den Blaauwen T.** (2005): Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Molecular Microbiology*. 55:1631–1645.
- Achenbach T.V., Göthel S.F. and Marahiel M.A.** (1997): Histidine 109 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *Bacillus subtilis* plays an important role in catalysis and in cyclosporin A binding. *FEMS Microbiol. Lett.* 154: 139-144.
- Adams D.W. and Errington J.** (2009): Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Rev. Microbiol.* 7: 642-653.
- Aghdasi B., Ye K., Resnick A., Huang A., Ha H.C., Guo X., Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H.** (2001): FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 2425-2430.
- 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.
- Ahn J.C., Kim D.W., You Y.N., Seok M.S., Park J.M., Hwang H., Kim B.G., Luan S., Park H.S., Cho H.S.** (2010): Classification of rice (*Oryza sativa* L. Japonica nipponbare) immunophilins (FKBPs, CYPs) and expression patterns under water stress. *BMC Plant Biol.* 10: 253.
- Akiyama Y., Kihara A., Tokuda H., Ito K.** (1996): FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 31196-31201.
- Alavi M. and Belas R.** (2001): Surface sensing, swarmer cell differentiation, and biofilm development. *Methods Enzymol.* 336: 29-40.
- Alcock F., Grossmann J., Gentle I., Likic V., Lithgow T., Tokatlidis K.** (2008): Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochem. J.* 409: 377-387.
- Aldridge C., Poonchareon K., Saini S., Ewen T., Soloyva A, Rao C.V., Imada K., Minamino T., Aldridge P.D.** (2010): The interaction dynamics of a negative feedback loop regulates flagellar number in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 78: 1416-1430.
- Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.** (2006): A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 59: 1114-1128.
- 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.
- Amikam D. and Galperin M.Y.** (2006): PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics.* 22: 3-6.
- Anderson S.K., Gallinger S., Roder J., Frey J., Young H.A., Ortaldo J.R.** (1993): A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 542-546.
- Anderson G.G., Palermo J.J., Schilling J.D., Roth R., Heuser J., Hultgren S.J.** (2003): Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301: 105-107.
- Anderson D.E., Gueiros-Filho, F.J., and Erickson, H.P.** (2004): Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J. Bacteriol.* 186: 5775-5781.

- Andreotti A.H.** (2003): Native state proline isomerization: an intrinsic molecular switch. *Biochemistry* 42: 9515-9524.
- Antoniani D., Bocci P., Maciąg 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.
- Antonoaea R., Först M., Nishiyama K. and Möller M.** (2008): The periplasmic chaperone PpiD interacts with secretory proteins exiting from the SecYEG translocon. *Biochem.* 47: 5649-5656.
- 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.
- Arévalo-Rodríguez M., Wu X., Hanes S.D., Heitman J.** (2004): Prolyl isomerase in yeast. *Front. Biosci.* 9: 2420-2446.
- Arevalo-Rodríguez M. and Heitman J.** (2005): Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 4: 17-29.
- 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.
- Arifuzzaman M., Maeda M., Itoh A., Nishikata K., Takita C., Saito R., Ara T., Nakahigashi K., Huang H.C., Hirai A., Tsuzuki K., Nakamura S., Altaf-Ul-Amin M., Oshima T., Baba T., Yamamoto N., Kawamura T., Ioka-Nakamichi T., Kitagawa M., Tomita M., Kanaya S., Wada C., Mori H.** (2006): Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res.* 16: 686-691.
- Arora K., Gwinn W.M., Bower M.A., Watson A., Okwumabua I., MacDonald H.R., Bukrinsky M.I., Constant S.L.** (2005): Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J. Immunol.* 175: 517-522.
- Arumugam S., Petrasek Z. and Schwille P.** (2014): MinCDE exploits the dynamic nature of FtsZ filaments for its spatial regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 111: 1192-1200.
- 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.
- Aumuller T., Jahreis G., Fischer G. and Schiene-Fischer C.** (2010): Role of prolyl cis/trans isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 protease activation. *Biochem. J.* 49: 1042-1052.
- Bailey M.W., Bissichia P., Warren B.T., Sherratt D.J. and Männik J.** (2014): Evidence for divisome localization mechanisms independent of the Min system and SlmA in *Escherichia coli*. *PLOS Genet.* 10: e1004504.
- Baker M.D., Wolanin P.M. and Stock J.B.** (2006): Systems biology of bacterial chemotaxis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 187-192.
- Bannon J.H., O'Donovan D.S., Kennelly S.M. and McGee M.M.** (2012): The peptidyl prolyl isomerase cyclophilin A localizes at the centrosome and the midbody and is required for cytokinesis. *Cell Cycle* 11: 1340-1353.
- 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: 1727-1237.
- Barik S.** (2006): Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 2889-2900.

- Begg K.J., Takasuga A., Edwards D.H., Dewar S.J., Spratt B.G., Adachi H. et al.** (1990): The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. *J Bacteriol* 172: 6697-6703.
- 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.
- Behrens S.** (2002): Periplasmic Chaperones—New Structural and Functional Insights. *Structure.* 10: 1469-1471.
- Belas R., Erskine D. and Flaherty D.** (1991): *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behaviour. *J. Bacteriol.* 19: 6279-6288.
- Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J.A., Molin S., Prensier G., Arbeille B., Ghigo J.M.** (2004): Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51: 659-674.
- Ben-Yehuda S. and Losick R.** (2002): Asymmetric Cell Division in *B. subtilis* Involves a Spiral-like Intermediate of the Cytokinetic Protein FtsZ. *Cell* 109: 257-266.
- Bennion D., Charlson E.S., Coon E., Misra R.** (2010): Dissection of beta-barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 77: 1153-1171.
- Be'er A. and Harshey R.M.** (2011): Collective motion of surfactant-producing bacteria imparts superdiffusivity to their upper surface. *Biophys. J.* 101: 1017-1024.
- Berardini T.Z., Bollman K., Sun H., Poethig R.S.** (2001): Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science* 291: 2405-2407.
- Berg H.C.** (2003): The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 19-54.
- Berg H.C. and Brown D.A.** (1972): Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature.* 239: 500-504.
- 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 phi X174. *Mol. Microbiol.* 45: 99-108.
- Bhaduri A., Misra R., Maji A., Bhetaria P.J., Mishra S., Arora G., Singh L.K., Dhasmana N., Dubey N., Viridi J.S., Singh Y.** (2014): Mycobacterium tuberculosis cyclophilin A uses novel signal sequence for secretion and mimics eukaryotic cyclophilins for interaction with host protein repertoire. *PLOS One.* 9: e88090.
- Bigot S., Corre J., Louarn J.M., Cornet F. and Barre F.X.** (2004): FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* 54.
- Bigot S., Saleh O.A., Lesterlin C., Pages C., El Karoui M., Dennis C., Grigoriev M., Allemand J.F., Barre F.X., Cornet F.** (2005): KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J.* 24: 3770-3780.
- 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.
- Bitto E. and McKay D.B.** (2003): The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 49316-49322.
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J.,**

- Mau B., Shao Y.** (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (New York, N.Y.) 277: 1453-1462.
- Blaauwen T.D., Lindqvist A., Löwe J., Nanninga N.** (2001): Distribution of the *Escherichia coli* structural maintenance of chromosomes (SMC)-like protein MukB in the cell. *Mol. Microbiol.* 42: 1179-1188.
- Blanchard C.Z., Lee Y.M., Frantom P.A., Waldrop G.L.** (1999): Mutations at four active site residues of biotin carboxylase abolish substrate-induced synergism by biotin. *Biochemistry* 38: 3393-3400.
- Blencowe D.K., Al Jubori S. and Morby A.P.** (2011): Identification of a novel function for the FtsL cell division protein from *Escherichia coli* K12. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 44-49.
- 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.
- Borel JF.** (2002): History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114: 433-437.
- Bordo D. and Bork P.** (2002): The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO* 3: 741-746.
- 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.
- Buchner J., Grallert H. and Jakob U.** (1998): Analysis of chaperone function using citrate synthase as a nonnative substrate. *Methods Enzymol.* 290: 323-338.
- 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.
- Burke C., Liu M., Britton W., Triccas J.A., Thomas T., Smith A.L., Allen S., Salomon R., Harry E.** (2013): Harnessing Single Cell Sorting to Identify Cell Division Genes and Regulators in Bacteria. *PLOS One.* 8: e60964.
- Cabré E.J., Sánchez-Gorostiaga A., Carrara P., Ropero N., Casanova M., Palacios P., Stano P., Jiménez M., Rivas G., Vicente M.** (2013): Bacterial division proteins FtsZ and ZipA induce vesicle shrinkage and cell membrane invagination. *J. Biol. Chem.* 288: 26625-26634.
- 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.
- Chai Q., Ferrell B., Zhong M., Zhang X., Ye C. and Wei Y.** (2014): Diverse sequences are functional at the C-terminus of the *E. coli* periplasmic chaperone SurA. *Protein Engineering, Design & Selection* 27: 111-116.
- Chaveroche M.K., Ghigo J.M. and d'Enfert C.** (2000): A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 28, E97.
- Chen B.G., Turner L. and Berg H.C.** (2007): The Wetting Agent Required for Swarming in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Not a Surfactant. *J Bacteriol.* 189: 8750-8753.
- Chen J.C. and Beckwith J.** (2001): FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for colocalization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol* 42: 395-413.
- Chen J.C., Weiss D.S., Ghigo J.M. and Beckwith J.** (1999): Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 521-530.
- Chen Y., Milam S.L., Erickson H.P.** (2012): SulA inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. *Biochemistry* 51: 3100-3109.

- Cho H., Jonsson H., Campbel K. Melke P., Williams J.W., Jedynak B., Stevens A.M., Groisman A., Levchenko A.** (2007): Self-Organization in High-Density Bacterial Colonies: Efficient Crowd Control. *PLOS Biology* 20075: e302.
- Cho H.B., McManus H.R., Dove S.L. and Bernhardt T.G.** (2011): Nucleoid occlusion factor SImA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 108: 3773-3778.
- Chilcott G.S. and Hughes K.T.** (2000): Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 694-708.
- Cho H.** (2015): **The role of cytoskeletal elements in shaping bacterial cells.** *J Microbiol Biotechnol.* 25: 307-316.
- Chung K.C. and Zamble D.B.** (2011): The *Escherichia coli* metal-binding chaperone SlyD interacts with the large subunit of [NiFe]-hydrogenase 3. *FEBS Lett.* 585: 291-294.
- Claessen D., Rozen D.E., Kuipers O.P., Søgaard-Andersen L. and van Wezel G.P.** (2014): Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 115-124.
- Climent I. and Rubio V.** (1986): ATPase activity of biotin carboxylase provides evidence for initial activation of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by ATP in the carboxylation of biotin. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 465-470.
- Clubb R.T., Thanabal V., Fejzo J., Ferguson S.B., Zydowsky L., Baker C.H., Walsh C.T. and Wagner G.** (1993): Secondary Structure and Backbone Resonance Assignments of the Periplasmic Cyclophilin Type Peptidyl-Prolyl Isomerase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 32: 6391-6401.
- Clubb R.T., Ferguson S.B., Walsh C.T. and Wagner G.** (1994): Three-dimensional solution structure of *Escherichia coli* periplasmic cyclophilin. *Biochem. J.* 33: 2761-2772.
- 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.
- Copeland M.F. and Weibel D.B.** (2009): Bacterial Swarming: A Model System for Studying Dynamic Selfassembly. *Soft Matter.* 5: 1174-1187.
- Corbin B.D., Geissler B., Sadasivam M. and Margolin W.** (2004): Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J.Bacteriol.* 186: 7736.
- Corbin B.D., Wang Y., Beuria T.K. and Margolin W.** (2007): Interaction between cell division proteins FtsE and FtsZ. *J. Bacteriol.* 189: 3026-3035.
- Cordell S.C., Robinson E.J.H. and Löwe J.** (2003): Crystal structure of the SOS cell division inhibitor Sula and in complex with FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 7889-7894.
- 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.
- Costerton J.W., Geesey G.G. and Cheng G.K.** (1978): How bacteria stick. *Sci. Am.* 238: 86-95.
- Costerton J.W., Stewart P.S. and Greenberg E.P.** (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- 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. USA.* 84: 5216-5220.
- Da Re S., Valle J., Charbonnel N., Beloin C., Latour-Lambert P., Faure P., Turlin E., Le Bouguéne C., Renauld-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.

- Dai K., Xu Y. and Lutkenhaus J.** (1996): Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *J. Bacteriol.* 178: 1328–1334.
- Dajkovic A., Lan G., Sun S.X., Wirtz D. and Lutkenhaus J.** (2008): MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr. Biol.* 18: 235-244.
- Daniels R., Vanderleyden J. and Michiels J.** (2004): Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 261-289.
- Daniels R., Reynaert S., Hoekstra H., Verreth C., Janssens J., Braeken K., Fauvart M., Beullens S., Heusdens C., Lambrechts I., De Vos D.E., Vanderleyden J., Vermant J., Michiels J.** (2006): Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 14965-14970.
- 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.
- Davey M.E. and O'Toole G.A.** (2000): Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- Davies D.** (2003): Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 114-122.
- 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., Dhe-Paganon S.** (2010): Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLOS Biol.* 8: e1000439.
- de Kievit TR.** (2009): Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 11: 279-288.
- 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.
- Deuerling E., Patzelt H., Vorderwülbecke S., Rauch T., Kramer G., Schaffitzel E., Mogk A., Schulze-Specking A., Langen H., Bukau B.** (2003): Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Mol. Microbiol.* 47: 1317-1328.
- Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T., Mogk A., Bukau B.** (1999): Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400: 693-696.
- 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.
- Dimou M., Venieraki A., Zografou C., Katinakis P.** (2012a): The cytoplasmic cyclophilin from *Azotobacter vinelandii* interacts with phosphate acetyltransferase isoforms enhancing their *in vitro* activity. *Mol. Biol. Rep.* 39: 4135-4143.
- Dimou M., Zografou C., Venieraki A., Katinakis P.** (2012b): Functional interaction of *Azotobacter vinelandii* cytoplasmic cyclophilin with the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424: 736-739.
- Dolinski K., Muir S., Cardenas M. and Heitman J.** (1997): All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13093-13098.
- 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.

- Dominguez-Solis J.R., He Z., Lima A., Ting J., Buchanan B.B., 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.
- 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.
- Donlan R.M.** (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890.
- Dorazi R. and Dewar S.J.** (2000): Membrane topology of the N-terminus of the *Escherichia coli* FtsK division protein. *FEBS Lett* 478: 13-18.
- Draper G.C., McLennan N., Begg K.J., Masters M. and Donachie W.D.** (1998): Only the N540 terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol* 180: 4621-4627.
- Du S. and Lutkenhaus J.** (2014): SlmA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD. *PLoS Genet* 10: e1004460.
- Duina A.A., Marsh J.A. and Gaber R.F.** (1996): Identification of two CyP-40-like cyclophilins in *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is required for normal growth. *Yeast* 12: 943-952.
- Dunne W.M.J.** (2002): Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 155-166.
- Dupaigne P., Tonthat N.K., Espeli O. Whitfill T., Boccard F. and Schumacher M.A.** (2012): Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome. *Mol.Cell* 48: 560-571.
- Durand-Heredia J.M., Yu H.H., De Carlo S., Lesser C.F., Janakiraman A.** (2011): Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193: 1405-1413.**
- Edwards K.J., Ollis D.L. and Dixon N.E.** (1997): Crystal structure of cytoplasmic *Escherichia coli* peptidyl-prolyl isomerase: evidence for decreased mobility of loops upon complexation. *J. Mol. Biol.* 271: 258-265.
- Eisenmesser E.Z., Millet O., Labeikovsky W., Korzhnev D.M., Wolf-Watz M., Bosco D.A. Skalicky J.J., Kay L.E., Kern D.** (2005): Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature* 438: 117-121.
- Eberl L., Christiansen G., Molin S., Givskov M.** (1996): Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J. Bacteriol.* 178: 554-559.
- Eberl L., Molin S. and Givskov M.** (1999): Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol.* 181: 1703-1712.
- Egan, A.J. and Vollmer W.** (2013): The physiology of bacterial cell division. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1277: 8-28.
- 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.
- Erickson H.P., Anderson D.E. and Osawa M.** (2010): FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 74: 504-528.
- Espeli O., Lee C. and Marians K.J.** (2003): A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278: 44639-44644.
- Espeli O., Borne R., Dupaigne P., Thiel A., Gigant E., Mercier R. et al.** (2012): A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J.* 31: 3198-3211.
- Fanghänel J. and Fischer G.** (2004): Insights into the catalytic mechanism of peptidyl-prolyl cis/trans Isomerases. *Frontiers in Bioscience* 9: 3453-3478.
- Fenton A.K. and Gerdes K.** (2013): Direct interaction of FtsZ and MreB is required for septum synthesis and cell division in *Escherichia coli*. *EMBO J* 32: 1953-1965.

- Ferbitz L., Maier T., Patzelt H., Bukau B., Deuerling E., Ban N.** (2004): Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* 431: 590-606.
- Ferreira R.B., Antunes L.C., Greenberg E.P., McCarter L.L.** (2008): *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J. Bacteriol.* 190: 851-860.
- Fersht A.** (1999): *Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* WH Freeman.
- 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: 223-239.
- Fischer G. and Schmid F.X.** (1990): The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* 29: 2205-2212.
- Fleming T.C., Shin J.Y., Lee S.H., Becker E., Huang K.C., Bustamante C., Pogliano K.** (2010): Dynamic SpoIIIIE assembly mediates septal membrane fission during *Bacillus subtilis* sporulation. *Genes Dev.* 24: 1160-1172.
- Flemming H.C. and Wingender J.** (2010): The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623-633.
- Forsburg S.L.** (2001): The art and design of genetic screens: yeast. *Nat. Rev. Genet.* 2: 659-668.
- Fotadar U., Zaveloff P. and Terracio L.** (2005): Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology* 45: 403-404.
- Fraser J.S., Clarkson M.W., Degnan S.C., Erion R., Kern D., and Alber T.** (2009): Hidden alternative structures of proline isomerase essential for catalysis. *Nature* 462: 669-673.
- Fraser G.M. and Hughes C.** (1999): Swarming motility. *Curr Opin. Microbiol.* 2: 630-635.
- Freinkman E., Chng S.S. and Kahne D.** (2011): The complex that inserts lipopolysaccharide into the bacterial outer membrane forms a two-protein plug-and-barrel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 2486-2491.
- 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.
- Fu G., Huang T., Buss J., Coltharp C., Hensel Z., Xiao J.** (2010): *In Vivo* Structure of the *E. coli* FtsZ-ring Revealed by Photoactivated Localization Microscopy (PALM). *PLOS ONE* 5:e12682.
- 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.
- Fulgosi H., Vener A.V., Altschmied L., Herrmann R.G., Andersson B.** (1998): A novel multifunctional chloroplast protein: identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *EMBO J.* 17: 1577-1587.
- Fuqua C., Winans S.C. and Greenberg E.P.** (1996): Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR–LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 727-751.
- Furness R.B., Fraser G.M., Hay N.A., Hughes C.** (1997): Negative feedback from *Proteus* class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. *J. Bacteriol.* 179: 5585-5588.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P.** (2005): Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 34-40.
- Gaestel M.** (2006): *Molecular Chaperones in Health and Disease.* Springer.



- Galat A.** (2003): Peptidylprolyl *cis/trans* isomerases (immunophilins): biological diversity - targets - functions. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 1315-1347.
- Gallay P.A.** (2009): Cyclophilin inhibitors. *Clin. Liver. Dis.* 13: 403-417.
- Galli E. and Gerdes K.** (2010): Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Mol. Microbiol.* 76: 1514-1526.
- Galli E., Gerdes K.** (2012): FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194: 292-302.
- Galperin M.Y.** (2004): Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.* 6: 552-567.
- Galperin M.Y.** (2010): Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 150-159.
- Gavini N., Tungtur S. and Pulakat L.** (2006): Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Independent Functional NifH Mutant of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 188: 6020-6025.
- 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.
- Geisler M., Kolukisaoglu H.U., Bouchard R., Billion K., Berger J., Saal B., Frangne N., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Dudler R., Blakeslee J.J., Murphy A.S., Martinoia E., Schulz B.** (2003): TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Mol. Biol. Cell* 14: 4238-4249.
- Ghigo J.M.** (2001): Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412: 442-445.
- Ghosh B. and Sain A.** (2011): Force generation in bacteria without nucleotide-dependent bending of cytoskeletal filaments. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 83: 051924.
- Giuseppe P., Atzingen M., Nascimento A., Zanchin N., Guimar G.** (2010): The crystal structure of the leptospiral hypothetical protein LIC12922 reveals homology with the periplasmic chaperone SurA. *J. Struct. Biol.* 173: 312-322.
- Goehring N.W. and Beckwith J.** (2005): Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* 15: 514-526.
- Gollan P.J. and Bhavé M.** (2010): A thylakoid-localised FK506-binding protein in wheat may be linked to chloroplast biogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 655-662.
- Gollan P.J., Bhavé 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.
- González Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W.E., and Wood, T.K.** (2006): Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J. Bacteriol.* 188: 305-306.
- Gonzalez M.D., Akbay E.A., Boyd D. and Beckwith J.** (2010): Multiple interaction domains in FtsL, a protein component of the widely conserved bacterial FtsLBQ cell division complex. *J. Bacteriol.* 192: 2757-2768.
- Gopalan G., He Z., Battaile K.P., Luan S., Swaminathan K.** (2006): Structural comparison of oxidized and reduced FKBP13 from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* 65: 789-795.
- 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.

- Götzke H., Palombo I., Muheim C., Perrody E., Genevaux P., Kudva R., Müller M. and Daley D.** (2014): YfgM Is an Ancillary Subunit of the SecYEG Translocon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 289: 19089-19097.
- Grathwohl C. and Wüthrich K.** (1981): NMR studies of the rates of proline cis–trans isomerization in oligopeptides. *Biopolymers* 20: 2623-2633.
- Gudavicius G., Dilworth D., Serpa J.J., Sessler N., Petrotchenko E.V., Borchers C.H., Nelson C.J.** (2014): The prolyl isomerase, FKBP25, interacts with RNA-engaged nucleolin and the pre-60S ribosomal subunit. *RNA* 20: 1014-1022.
- Gullerova M., Barta A., 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: 63-643.
- 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.
- Haagmans W. and van der Woude M.** (2000): Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Mol. Microbiol.* 35: 877-887.
- Hagan C.L., Kim S. and Kahne D.** (2010): Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* 328: 890-892.
- Hagan C.L., Silhavy T. and Kahne D.** (2011):  $\beta$ -Barrel membrane protein assembly by the Bam Complex. *Annu. Rev. Biochem.* 80: 189-210.
- Haendler B., Keller R., Hiestand P.C., Kocher H.P., Wegmann G., Movva N.R.** (1989): Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene* 83: 39-46.
- Hale C.A. and de Boer P.A. J.** (1997): Direct Binding of FtsZ to ZipA, an Essential Component of the Septal Ring Structure That Mediates Cell Division in *E. coli*. *Cell.* 88: 175-185.
- Hale C.A. and de Boer P.A. J.** (1999): Recruitment of ZipA to the Septal Ring of *Escherichia coli* Is Dependent on FtsZ and Independent of FtsA. *J. Bacteriol.* 181: 167-176.
- Hamdane M., Dourlen P., Bretteville A., Sambo A.V., Ferreira S., Ando K., Kerdraon O., Bégard S., Geay L., Lippens G., Sergeant N., Delacourte A., Maurage C.A., Galas M.C., Buée L.** (2006): Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol. Cell Neurosci.* 32: 155-160.
- Hammar M., Arnqvist A., Bian Z., Olsén A., Normark S.** (1995): Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 18: 66-670.
- 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.
- Hanes S.D., Shank P.R. and Bostian K.A.** (1989): Sequence and mutational analysis of *ESS1*, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5: 55-72.
- Haney S.A., Glasfeld E., Hale C., Keeney D., He Z., de Boer P.** (2001): Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ.ZipA interaction in the yeast two-hybrid system Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J Biol Chem.* 276: 11980-11987.
- Hani J., Stumpf G. and Domdey H.** (1995): *PTF1* encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Lett.* 365: 198-202.

- Harding M.W., Galat A., Uehling D.E., Schreiber S.L.** (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341: 758-760.
- Harshey R.M.** (1994): Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 13: 389-394.
- Harshey R.M.** (2003): Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 249-273.
- 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: 8631-8635.
- Hartman J.L., Garvik B. and Hartwell L.** (2001): Principles for the buffering of genetic variation. *Science*. 291: 1001-1004.
- Harry E.J.** (2001): Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol. Microbiol.* 40: 795-803.
- Hayano T., Takahashi N., Kato S., Maki N. and Suzuki M.** (1991): Two Distinct Forms of Peptidylprolyl-cis-trans-isomerase Are Expressed Separately in Periplasmic and Cytoplasmic Compartments of *Escherichia coli* Cells. *Biochem. J.* 30: 3041-3048.
- Hazelbauer G.L., Falke J.J., Parkinson J.S.** (2008): Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem. Sci.* 33: 9-19.
- He Z., Li L. and Luan S.** (2004): Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1248-1267.
- Hennecke G., Nolte N., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J. and Behrens S.** (2005): The Periplasmic Chaperone SurA Exploits Two Features Characteristic of Integral Outer Membrane Proteins for Selective Substrate Recognition. *J. Biol. Chem.* 280: 23540-23548.
- 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. *Biochem.* 37: 5953-5960.
- Henrichsen J.** (1972): Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36: 478-503.
- Herrler M., Bang H. and Marahiel M.A.** (1994): Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Mol. Microbiol.* 11:1073-1083.
- Harshey R.M.** (2003): Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57: 249-273.
- Hoffmann A., Bukau B. and Kramer G.** (2010): Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803: 650-661.
- Hoffmann H. and Schiene-Fischer C.** (2014): Functional aspects of extracellular cyclophilins. *J. Biol. Chem.* 395: 721-735.
- 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.
- 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.
- Howard B.A., Furumai R., Campa M.J., Rabbani Z.N., Vujaskovic Z., Wang X.F., Patz E.F.** (2005): Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* 65: 8853-8860.

- Howard K.S., McLean P.A., Hansen F.B., Lemley P.V., Koblan K.S. and Orme-Johnson W.H.** (1986): *Klebsiella pneumoniae nifM* Gene Product Is Required for Stabilization and Activation of Nitrogenase Iron Protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261: 772-778.
- Hu Z. and Lutkenhaus J.** (1990): Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. J. Mol. Biol. 34: 82-90.
- Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C., Carroll A.S., Howson R.W., Weissman J.S., O'Shea E.K.** (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. Nature 425: 686-691.
- Huisman O., D'ari R. and Gottesman S.** (1984): Cell-division control in *Escherichia coli*: Specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4490-4494.
- Hunstad D.A., Justice S.S., Hung C.S., Lauer S.R., Hultgren S.J.** (2005): Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 73: 3999-4006.
- Hyryläinen H.L., Marciniak B.C., Dahncke K., Pietiäinen M., Courtin P., Vitikainen M., Seppala R., Otto A., Becher D., Chapot-Chartier M.P., Kuipers O.P. and Kontinen V.P.** (2010): Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 77: 108-127.
- Iki T., Yoshikawa M., Meshi T., Ishikawa M.** (2012): Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. EMBO J. 31: 267-278.
- 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: 4791-4796.
- Ingerman E. and Nunnari J.** (2005): A continuous, regenerative coupled GTPase assay for dynamin-related proteins. Methods Enzymol. 404: 611-619.
- 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.
- 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.
- Ishikawa S., Kawai Y., Hiramatsu K., Kuwano M., Ogasawara N.** (2006): A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 60:1364-1380.
- Jacob R.P. and Schmid F.X.** (2008): Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding. J. Mol. Biol. 377: 1560-1575.
- 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.
- Jarrell K.F., McBride M.J.** (2008): The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. Nat Rev Microbiol. 6: 466-476.
- 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.
- Jodi L., Hoskins J.R., and Wickner S.** (2009): ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. PNAS 106: 10619.

- Johansen J., Rasmussen A.A., Overgaard M., Valentin-Hansen P.** (2006): Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J. Mol. Biol.* 364: 1-8.
- Jordens J., Janssens V., Longin S., Stevens I., Martens E., Bultynck G., Engelborghs Y., Lescrinier E., Waelkens E., Goris J., Van Hoof C.**(2006): The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J. Biol. Chem.* 281: 6349-6357.
- Justice S., Hunstad D., Harper J., Duguay A., Pinkner J., Bann J., Frieden C., Silhavy T. and Hultgren S.** (2005): Periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 7680-7686.
- Justice S.S., Lauer S.R., Hultgren S.J., Hunstad D.A.** (2006): Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. *Infect. Immun.* 74: 4793-4800.
- Kader A. Simm R., Gerstel U., Morr M., Römling U.** (2006): Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 60: 602-616.
- Kale A., Phansopa C., Suwannachart C., Craven J., Rafferty J. and Kelly J.** (2011): The Virulence Factor PEB4 (Cj0596) and the Periplasmic Protein Cj1289 Are Two Structurally Related SurA-like Chaperones in the Human Pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 286: 21254-21265.
- Kamphausen T., Fanghanel R., Neumann D., Schulz B., Rahfeld J.U.** (2002): Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J.* 32: 263-276.
- 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. USA* 94: 4978-4981.
- 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.
- Karzai A.W. and McMacken R.** (1996): A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *J. Biol. Chem.* 271: 11236-11246.
- Kawamukai M., Matsuda H., Fujii W., Utsumi R. and Komano T.** (1989): Nucleotide sequences of *fic* and *fic-1* genes involved in cell filamentation induced by cyclic AMP in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171: 4525-4529.
- Kearns D.B.** (2010): A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews MicroBiology* 8: 634-644.
- Kearns D.B. and Losick R.** (2003): Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49: 581-590.
- 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.
- Kessler D., Papatheodorou P., Stratmann T., Dian E.A., Hartmann-Fatu C., Rassow J., Bayer P., 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 Mol. Biol.* 5: 37.
- Kim T., Lee J. and Kim K.** (2013): *Escherichia coli* YmdB regulates biofilm formation independently of its role as an RNase III modulator. *BMC Microbiology* 13: 266.
- Kim Y.K. and McCarter L.L.** (2007): ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 189: 4094-4107.
- Kim W. and Surette M.G.** (2004): Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* 54: 702-714.

- 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.
- Kihara A., Akiyama Y. and Ito K.** (1996): A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.* 15: 6122-6131.
- Kjaergaard K., Schembri M.A., Ramos C., Molin S., Klemm P.** (2000): Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ. Microbiol.* 2: 695-702.
- 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.
- Klemm P., Hjerrild L., Gjermansen M., Schembri M.A.** (2004): Structure function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 51: 283-296.
- Knappe T.A., Eckert B., Schaarschmidt P., Scholz C., Schmid.F.X.** (2007): Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J. Mol. Biol.* 368: 1458-1468.
- 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. *Biochem. J.* 30: 6127-6134.
- 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.
- Konno M., Ito M., Hayano T. and Takahashi N.** (1996): The substrate-binding site in *Escherichia coli* cyclophilin A preferably recognizes a cis-proline isomer or a highly distorted form of the trans isomer. *J. Mol. Biol.* 256: 897-908.
- Kontinen, V. and Sarvas M.** (1993): The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Mol. Microbiol.* 8: 727-737.
- Koser P.L., Sylvester D., Livi G.P., Bergsma D.J.** (1990): A second cyclophilinrelated gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18: 1643.
- 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 PPIases in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 150: 1160-1173.
- Kramer G., Rauch T., Rist W., Vorderwülbecke S., Patzelt H., Schulze-Specking A., Ban N., Deuerling E., Bukau B.** (2002): L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* 419: 171-174.
- Krasteva P.V., Giglio K.M. and Sondermann H.** (2012): Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci.* 21: 929-948.
- Kubitschek H.E.** (1990): Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol.* 172: 94-101.
- Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M., O'Toole G.A.** (2007): BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 189: 8165-8178.
- Kühlewein A., Voll G., Alvarez B., Kessler H., Fischer G., Rahfeld J.U. and Gemmecker G.** (2004): Solution structure of *Escherichia coli* Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. *Protein Sci.* 13: 2378-2387.
- Kumar, M., and Sourjik, V.** (2012): Physical map and dynamics of the chaperone network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 84: 736-747.

- Lan G., Daniels B.R., Dobrowsky T.M., Wirtz D. and Sun S.X.** (2009): Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 121-126.
- Landrieu I., De Veylderi L., Fruchart J.S., Odaert B., Casteelsi P., Portetelle D., Montagui M., Inzè D. and Lippens G.** (2000): The *Arabidopsis thaliana* PIN1At Gene Encodes a Single-domain Phosphorylation-dependent Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase. *J. Biol. Chem.* 275: 10577-10581.
- Lapointe L.M., Taylor K.C., Subramaniam S., Khadria A., Rayment I. and Senes A.** (2013): Structural Organization of FtsB, a Transmembrane Protein of the Bacterial Divisome. *Biochemistry* 52: 2574-2585.
- Lara, B., and Ayala, J.A.** (2002): Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiol Lett.* 216: 23-32.
- Laufen T., Mayer M.P., Beisel C., Klostermeier D., Mogk A., Reinstein J, Bukau B.** (1999): Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5452-5457.
- Laverty G., Gorman S.P. and Gilmore B.F.** (2014): Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens* 3: 596-632.
- Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., Caldwell D.E.** (1991): Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173: 6558–6567.
- Lawrence S.H. and Ferry J.G.** (2006): Steady-state kinetic analysis of phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 188:1155-1158.
- Lazar S.W. and Kolter R.** (1996): SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 178: 1770-1773.
- Lee J., Jayaraman A. and Wood T.K.** (2007b): Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol* 7: 42.
- Lee J., Page R., García-Contreras R., Palermino J.M., Zhang X.S., Doshi O. Wood TK, Peti W.** (2007a): Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *J. Mol. Biol.* 373: 11-26.
- Lewis K.** (2005): Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem. (Mosc)* 70: 267-274.
- Li G. and Young K.D.** (2012): Isolation and identification of new inner membrane-associated proteins that localize to cell poles in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 84: 276-295.
- 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.
- Li H. and Luan S.** (2011): The cyclophilin AtCYP71 interacts with CAF-1 and LHP1 and functions in multiple chromatin remodeling processes. *Mol. Plant* 4: 748-758.
- Li Y., Hsin J., Zhao L., Cheng Y., Shang W., Huang K.C., Wang H.W., Ye S.** (2013): FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. *Science.* 341: 392-395.
- Li Z., Trimble M.J., Brun Y.V. and Jensen G. J.** (2007): The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* 26: 4694-4708.
- Liberek K., Marszałek J., Ang D., Georgopoulos C. and Zylicz M.** (1991): *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2874-2878.
- 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. USA* 103: 12631-12636.

- Lin C.H., Li H.Y., Lee Y.C., Calkins M.J., Lee K.H., Yang C.N. and Lu P.J.** (2015): Landscape of Pin1 in the cell cycle. *Experimental Biology and Medicine* 240: 403-408.
- 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.
- Lindow S.E. and Brandl M.T.** (2003): Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Liu B., Persons L., Lee L. and de Boer P.A.J.** (2015): Roles for both FtsA and the FtsBLQ subcomplex in FtsN-stimulated cell constriction in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 95: 945-970.
- Liu G., Draper G.C. and Donachie W.D.** (1998): FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 29: 893-903.
- Liu J., Farmer J.D., Lane W.S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S.L.** (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- Liu J., Lai M., Ang S., Shu J., Soo P., Horng Y., Yi W., Lai H., Luh K., Ho S., Swift S.** (2000): Role of *flhDC* in the expression of the nuclease gene *nucA*, cell division and flagellar synthesis in *Serratia marcescens*. *J. Biomed Sci.* 7: 475-483.
- Liu J. and Walsh C.** (1990): Peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from *Escherichia coli*: A periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4028-4032.
- Liu J. and Walsh C.** (1991): Human and *Escherichia coli* Cyclophilins: Sensitivity to Inhibition by the Immunosuppressant Cyclosporin A Correlates with a Specific Tryptophan Residue. *Biochem. J.* 30: 2306-2310.
- 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.
- Liu X. and Matsumura P.** (1994): The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* 176: 7345-7351.
- Lockhart A. and Kendrick-Jones J.** (1998): Interaction of the N-terminal domain of MukB with the bacterial tubulin homologue FtsZ. *FEBS Lett.* 430: 278-282.
- Lopez D. and Kolter R.** (2009): Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 134-149.
- Lopez D., Fischbach M.A., Chu F., Losick R., Kolter R.** (2009a): Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 280-285.
- Lowe J. and Amos L.A.** (1998): Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature.* 391: 203-206.
- Lu C., Reedy M. and Erickson H.P.** (2000): Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* 182: 164-170.
- Lu K.P., Hanes S.D., Hunter T.** (1996): A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380: 544-547.
- Lu P.J., Wulf G., Zhou X.Z., Davies P., Lu K.P.** (1999b): The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399: 784-788.
- 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.
- Lu, K.P. and Zhou X.Z.** (2007): The prolyl isomerase Pin1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 904-916.



- Lutkenhaus J.** (2007): Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 539-562.
- Lutkenhaus J., Pichoff S. and Du S.** (2012): Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. *Cytoskeleton* 69: 778-790.
- Ma X., Ehrhardt D.W. and Margolin W.** (1996): Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12998-13003.
- Ma X., Margolin W.** (1999): Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J. Bacteriol.* 181:7531-7544.
- Macarthur M.W., Thornton J.M.** (1991): Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218: 397-412.
- Macnab R.M.** (2003): How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77-100.
- Macqueen A.J. and Roeder G.S.** (2009): Fpr3 and Zip3 ensure that initiation of meiotic recombination precedes chromosome synapsis in budding yeast. *Curr. Biol.* 19: 1519-1526.
- Maddalo G., Stenberg-Bruzell F., Götzke H., Toddo S., Björkholm P., Eriksson E., Chovanec P., Genevaux P., Lehtiö J., Ilag L., and Daley D.** (2011): Systematic Analysis of Native Membrane Protein Complexes in *Escherichia coli*. *J. Proteome Res.* 10: 1848-1859.
- Magliery T.J., Wilson C.G., Pan W., Mishler D., Ghosh I., Hamilton A.D., Regan L.** (2005): Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 146-157.
- 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. *Biochem.* 49: 8626-8635.
- Männik J. and Bailey M.W.** (2015): Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 6: 306.
- Margolin W.** (2005): FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 862-871.
- Marks A.R.** (1996): Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.* 76: 631-649.
- Maruyama T., Suzuki R., Furutani M.** (2004): Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases) update 2004. *Front Biosci.* 9: 1680-1720.
- Martin M.F. and Liras P.** (1989): Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 173-206.
- Masson S., Kern T., Le Gouellec A., Giustini C., Simorre J.P., Callow P. et al.** (2009): Central domain of DivIB caps the C-terminal regions of the FtsL/DivIC coiled-coil rod. *J. Biol. Chem.* 284:27687-27700.
- 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.
- 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: 2295-2302.
- McDonough K.A. and Rodriguez A.** (2012): The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 27-38.
- McDougald D., Rice S.A., Barraud N., Steinberg P.D., Kjelleberg S.** (2012): Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 39-50.

- McLaughlin M.M., Bossard M.J., Koser P.L., Cafferkey R., Morris R.A., Miles L.M., Strickler J., Bergsma D.J., Levy M.A., Livi G.P.** (1992): The yeast cyclophilin multigene family: purification, cloning and characterization of a new isoform. *Gene* 111: 85-92.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 D1Par13. *J. Biol. Chem.* 276: 13524-13529.
- Mileykovskaya E., Sun Q., Margolin W. and Dowhan W.** (1998): Localization and Function of Early Cell Division Proteins in Filamentous *Escherichia coli* Cells Lacking Phosphatidylethanolamine. *Bacteriol.* 180: 4252-4257.
- Mingorance J., Rivas G., Vélez M., Gómez-Puertas, P. and Vicente M.** (2010): Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends Microbiol.* 18: 348-356.
- 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.
- Missiakas D., Betton J.M., Raina S.** (1996): New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* 21: 871-884.
- Mohammadi T., van Dam V., Sijbrandi R., Vernet T., Zapun A., Bouhss A. et al.** (2011): Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 30: 1425-1432.
- Molshanski-Mora S., Yosefa I., Kiroa R., Edgara R., Manora M., Gershovitsb M., Lasersonb M., Pupkob T. and Qimron U.** (2014): Revealing bacterial targets of growth inhibitors encoded by bacteriophage T7. *PNAS* 111: 18715-18720.
- Monahan L.G., Harry E.J.** (2013): Identifying how bacterial cells find their middle: a new perspective. *Mol. Microbiol.* 87:231-234.
- Moore I., Schell J. and Palme K.** (1995): A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem. Sci.* 20: 12-14.
- Mosyak L., Zhang Y., Glasfeld E., Haney S., Stahl M., Seehra J. and Somers W.S.** (2000): The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *Embo J.* 19: 3179-3191.
- Mueller J.W., Kessler D., Neumann D., Stratmann T., Papatheodorou P., Hartmann-Fatu C., Bayer P.** (2006): Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC Mol. Biol.* 7: 9.
- Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T., Tsujimoto Y.** (2005): Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652-658.

- 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.
- Nelson C.J., Santos-Rosa H., Kouzarides T.** (2006): Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126: 905-916.
- 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.
- Nanninga N.** (1998): Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 110-129.
- Natale P., Pazos M., Vicente M.** (2013): The *Escherichia coli* divisome: born to divide. *Environ. Microbiol.* 15: 3169-3182.
- 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: 237-246.
- Nigam S.K., Jin Y.J., Jin M.J., Bush K.T., Bierer B.E., Burakoff S.J.** (1993): Localization of the FK506-binding protein, FKBP 13, to the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 294: 511-5515.
- Nigro P., Pompilio G., Capogrossi M.C.** (2013): Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* 4: e 888.
- Niki H., Yamaichi Y. and Hiraga S.** (2000): Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 14: 212-223.
- Nogales E., Downing K.H., Amos L.A., Lowe J.** (1998): Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* 5: 451-458.
- Nørregaard-Madsen M., Mygind B., Pedersen R., Valentin-Hansen P. and Søgaard-Andersen L.** (1994): The gene encoding the periplasmic cyclophilin homologue, PPIase 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Oh K., Ivanchenko M.G., White T.J., Lomax T.L.** (2006): The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta* 224: 133-144.
- O'Keefe S.J., Tamura J., Kincaid R.L., Tocci M.J., O'Neill E.A.** (1992): FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357: 692-694.
- Oliva M.A., Cordell S.C., Löwe J.** (2004): Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1243-1250.
- Olsén A., Jonsson A., Normark S.** (1989): Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338: 652-655.

- Olsen P.B. and Klemm P.** (1994): Localization of promoters in the *fim* gene cluster and the effect of HNS on the transcription of *fimB* and *fimE*. FEMS Microbiol. Lett. 116: 95-100.
- Ono K., Oka R., Toyofuku M., Sakaguchi A., Hamada M., Yoshida S., Nomura N.** (2014): cAMP signaling affects irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbes Environ. 29: 104-106.
- 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.
- 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.
- 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.
- Osawa M., Anderson D.E. and Erickson H.P.** (2008): Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. Science 320: 792-794.
- O'Toole G.A. and Kolter R.** (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30: 295-304.
- 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.
- Park J.T. and Uehara T.** (2008): How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). Microbiol Mol Biol Rev 72: 211-227.
- Park S.K., Xiao H. and Lei M.** (2014): Nuclear FKBP, Fpr3 and Fpr4 affect genome-wide genes transcription. Mol. Genet. Genomics 289: 125-136.
- Partridge J.D. and Harshey R.M.** (2013): Swarming: Flexible Roaming Plans. Bacteriol. 195: 909-918.
- Patrick W.M., Qu E.M., Swartzl D.B. and Matsumura I.** (2007): Multicopy suppression underpins metabolic evolvability. Mol. Biol. Evol. 24: 2716-2722.
- Pearson M.M., Rasko D.A., Smith S.N., Mobley H.L.** (2010): Transcriptome of Swarming *Proteus mirabilis*. Infect. Immun. 78: 2834-2845.
- Peng L., Fukao Y., Fujiwara M., Takami T., Shikanai T.** (2009): Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. Plant Cell 21: 3623-3640.
- Petrovics G., Putnoky P., Reuhs B., Kim J., Thorp T.A., Noel K.D., Carlson R.W., Kondorosi A.** (1993): The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. J. Mol. Biol. 8: 1083-1094.
- Phadtare S. and Inouye M.** (2004): Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruplecsp-deletion strains of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186: 7007-7014.
- Pichoff S., Du S. and Lutkenhaus J.** (2015): The bypass of ZipA by overexpression of FtsN requires a previously unknown conserved FtsN motif essential for FtsA-FtsN interaction supporting a model in which FtsA monomers recruit late cell division proteins to the Z ring. Mol. Microbiol. 95: 971-987.
- Pichoff S. and Lutkenhaus J.** (2005): Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. Mol. Microbiol. 55: 1722-1734.

- 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.
- Pogorelko G.V., Mokryakova M., Fursova O.V., Abdeeva I., Piruzian E.S., Bruskin S.A.** (2014): Characterization of three *Arabidopsis thaliana* immunophilin genes involved in the plant defense response against *Pseudomonas syringae*. *Gene* 538: 12-22.
- Potluri L.P., Kannan S. and Young K.D.** (2012): ZipA is required for FtsZ-dependent preseptal peptidoglycan synthesis prior to invagination during cell division. *J Bacteriol* 194: 5334-5342.
- 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.
- Price E.R., Zydowsky L.D., Jin M.J., Baker C.H., Mc Keon F.D., Walsh C.T.** (1991): Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1903-1907.
- Price N. and Raivio T.** (2009): Characterization of the Cpx Regulon in *Escherichia coli* Strain MC4100, *J. Bacteriol.* 191: 1798-1815.
- Prigent-Combaret C., Brombacher E., Vidal O., Ambert A., Lejeune P., Landini P., 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.
- Prüss B.M., Verma K., Samanta P., Sule P., Kumar S., Wu J., Christianson D., Horne S.M., Stafslie S.J., Wolfe A.J., Denton A.** (2010): Environmental and genetic factors that contribute to *Escherichia coli* K-12 biofilm formation. *Arch Microbiol.* 192:715-728.
- Purdy G.E., Fisher C.R., Payne S.M.** (2007): IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *J. Bacteriol.* 189: 5566-5573.
- 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.
- Rathbun K.M., Hall J.A. and Thompson S.A.** (2009): Cj0596 is a periplasmic peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase involved in *Campylobacter jejuni* motility, invasion, and colonization. *BMC Microb.* 9: 160.
- Rahfeld J.U., Schierhorn A., Manne K., Fischer G.** (1994a): A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 343: 65-69.
- Rahfeld J.U., Röcknagel K.P., Schelbert B., Ludwig B., Hacker J., Mann K. and Fischer G.** (1994b): Confirmation of the existence of a third family among peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett.* 352: 180-184.
- 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: 22130-22138.
- 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.
- Raivio T.L. and Silhavy T.J.** (2001): Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 591-624.
- Raja K., Pulakat L. and Gavini N.** (2006): Genetic Complementation Studies of Human Pin1 in *Azotobacter vinelandii* Revealed that it Requires Amino Terminus of the NifM to Deliver PPIase Effect to the Fe-protein of Nitrogenase. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2: 25-32.

- Ramirez-Arcos S., Szeto J., Beveridge T.J., Victor C., Francis F. and Dillon J.A.R.** (2001): Deletion of the cell-division inhibitor MinC results in lysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* 147: 225-237.
- Ramirez-Arcos S., Greco V., Douglas H., Tessier D., Fan D., Szeto J., Wang J., and Dillon J. R.** (2004): Conserved Glycines in the C Terminus of MinC Proteins Are Implicated in Their Functionality as Cell Division Inhibitors. *J. Bacteriol.* 186: 2841–2855.
- 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: 875-886.
- Rather P.N.** (2005): Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ. Microbiol.* 7: 1065-1073.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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: 933-946.
- Reuhs B.L., Carlson R.W. and Kim J.S.** (1993): *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 3570-3580.
- Rico A.I., Garcia-Ovalle M., Mingorance J. and Vicente M.** (2004): Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol. Microbiol.* 53: 1359-1371.
- Rico A.I., Krupka M., Vicente M.** (2013): In the beginning, *Escherichia coli* assembled the proto-ring: an initial phase of division. *J Biol Chem.* 288: 20830-20836.
- Rico A.I., Garcia-Ovalle M., Palacios P., Casanova M. and Vicente M.** (2010): Role of *Escherichia coli* FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring. *Mol. Microbiol.* 76: 760-771.
- Rines D.R., Thomann D., Dorn J.F., Goodwin P. and Sorger P.K.** (2011): Live cell imaging of yeast. *Cold Spring Harb. Protoc.* 9: 1026-1041.
- Rizzitello A.E., Harper J.R., Silhavy T.J.** (2001): Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 6794-6800.
- Rollauer S.E., Soorshjani M.A., Noinaj N., Buchanan S.K.** (2015): Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* 370(1679).
- Romano P., He Z.Y., Luan S.** (2004): Introducing immunophilins, from organ transplantation to plant biology. *Plant Physiol.* 134: 1241-1243.
- Romano P.G., Horton P., Gray J.E.** (2004): The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol.* 134: 1268-1282.
- Romberg L. and Levin P.A.** (2003): Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FTSZ: poised at the edge of stability. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 125-154.
- Römling, U.** (2005): Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 1234-1246.
- Ron E.Z. and Rosenberg E.** (2001): Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3: 229-236.

- Roof W.D., Horne S.M., Young K.D., Young R.** (1994): slyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases. *J. Biol. Chem.* 269: 2902-2910.
- Rosen M.K., Standaert R.F., Galat A., Nakatsuka M., Schreiber S.L.** (1990): Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate. *Science* 248: 863-866.
- Roset M.S., García Fernández L., DelVecchio V.G., Briones G.** (2013): Intracellularly induced cyclophilins play an important role in stress adaptation and virulence of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 81: 521-530.
- Rouviere P.E., 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.
- Rudrappa T., Biedrzycki M.L. and Bais H.P.** (2008): Causes and consequences of plant associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 153-166.
- Rueda S., Vicente, M. and Mingorance J.** (2003): Concentration and assembly of the division ring 747 proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol.* 185: 3344-3351.
- Rulten S., Thorpe J. and Kay J.** (1999): Identification of eukaryotic parvulin homologues: a new subfamily of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 557-562.
- Rybenkov V.V., Herrera V., Petrushenko Z.M., Zhao H.** (2014): MukBEF, a Chromosomal Organizer. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 24: 371-383.
- Ryo A., Nakamura M., Wulf G., Liou Y.C., Lu K.P.** (2001): Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat. Cell Biol.* 3: 793-801.
- Ryo A., Togo T., Nakai T., Hirai A., Nishi M., Yamaguchi A., Suzuki K., Hirayasu Y., Kobayashi H., Perrem K., Liou Y.C., Aoki I.** (2006): Prolyl-isomerase Pin1 accumulates in lewy bodies of parkinson disease and facilitates formation of alpha-synuclein inclusions. *J. Biol. Chem.* 281:4117-4125.
- Sachelaru I., Petriman N.A., Kudva R., Koch H.G.** (2014): Dynamic interaction of the sec translocon with the chaperone PpiD. *J. Biol. Chem.* 289: 21706-21715.
- Saito T., Niwa Y., Ashida H., Tanaka K., Kawamukai M., Matsuda H., Nakagawa T.** (1999): Expression of a gene for cyclophilin which contains an amino-terminal endoplasmic reticulum-targeting signal. *Plant Cell Physiol.* 40: 77-87.
- Salveti 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.
- Sanchez E.R.** (2012): Chaperoning steroidal physiology: lessons from mouse genetic models of Hsp90 and its cochaperones. *Biochim. Biophys. Acta* 1823: 722-729.
- 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.
- Sauer K.** (2003): The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4: 219.
- Saul F.A., Arie J.P., Vulliez-le Normand B., Kahn R., Betton J.M., 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.
- Schembri M.A., Kjærgaard K. and Klemm P.** (2003): Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48: 253-267.
- Schmid F.X.** (1993): Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 123-142.

- Schmidpeter P., Jahreis G., Geitner A.J. and Schmid F.** (2011): Prolyl Isomerases Show Low Sequence Specificity toward the Residue Following the Proline. *Biochem.* 50: 4796-4803.
- Schmidpeter P.A.M. and Schmid F.X.** (2015): Prolyl Isomerization and Its Catalysis in Protein Folding and Protein Function. *J. Mol. Biol.* 427: 1609-1631.
- Scholz C., Zarnt T., Kern G., Lang K., Burtscher H., Fischer G. and Schmid F. X.** (1996): Autocatalytic folding of the folding catalyst FKBP12. *J. Biol. Chem.* 271: 12703-12707.
- Scholz C., Rahfeld J., Fischer G. and Schmid F.X.** (1997a): Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol. Biol.* 273: 752-762.
- 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.
- Scholz C., Eckert B., Hagn F., Schaarschmidt P., Balbach J., Schmid F.X.** (2006): SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochem.* 45: 20-33.
- Schönbrunner E.R., Mayer S., Tropschug M., Fischer G., Takahashi N. and Schmid F.X.** (1991): Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.* 266: 3630-3635.
- Schröder H., Langer T., Hartl F.U., Bukau B.** (1993): DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 12: 4137-4144.
- Schwalm J., Mahoney T.F., Soltis G.R., Silhavy T.J.** (2013): A role for Skp in LptD assembly in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 195: 3734-3742.
- Sekerina E., Rahfeld J.U., Müller J., Fanghänel J., Rascher C., Fischer G. and Bayer P.** (2000): NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *J. Mol. Biol.* 301: 1003-1017.
- 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.
- Shen B. and Lutkenhaus J.** (2009): The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. *Mol. Microbiol.* 72: 410-424.
- Shen B. and Lutkenhaus J.** (2010): Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol. Microbiol.* 75: 1285-1298.
- Shiomi D. and Margolin W.** (2007): The C-terminal domain of MinC inhibits assembly of the Z ring in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189: 236-243.
- Shou W., Aghdasi B., Armstrong D.L., Guo Q., Bao S., Charng 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.
- Siekierka J.J., Hung S.H., Poe M., Lin C.S., 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.
- 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. USA* 100: 868-873.
- Singh J.K., Makde R.D., Kumar V., Panda D.** (2007): A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochem.* 46: 11013-11022.
- Singh J.K., Makde R.D., Kumar V., Panda D.** (2008): A Membrane Protein, EzrA, Regulates Assembly Dynamics of FtsZ by Interacting with the C-Terminal Tail of FtsZ, *Biochem.* 47: 8465.



- 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: 255-266.
- Sklar J.G., Wu T., Kahne D., Silhavy T.J.** (2007): Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 21: 2473-2484.
- Sklar J.G., Wu T., Kahne D., Silhavy T.J.** (2007b): Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 21: 2473-2484.
- Skoog K. and Daley D.O.** (2012): The *Escherichia coli* cell division protein ZipA forms homodimers prior to association with FtsZ. *Biochemistry* 51: 1407-1415.
- Small E., Marrington R., Rodger A., Scott D. J., Sloan K., Roper D., Dafforn T.R. and Addinall S.G.** (2007): FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. *J. Mol. Biol.* 369: 210-221.
- Smith D.F., Baggenstoss B.A., Marion T.N., Rimerman R.A.** (1993): Two FKBP-related proteins are associated with progesterone receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 268: 18365-18371.
- Smith J.L., Fratamico P.M. and Novak J.S.** (2004): Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J. Food Prot.* 67: 1053-1070.
- Smyczynski C., Roudier F., Gissot L., Vaillant E., Grandjean O., Morin H., Masson T., Bellec Y., Geelen D., Faure J.D.** (2006): The C terminus of the immunophilin PASTICCINO1 is required for plant development and for interaction with a NAC-like transcription factor. *J. Biol. Chem.* 281: 25475-25484.
- 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.
- Somarelli J., Lee S., Skolnick J., Herrera R.J.** (2008): Structure-based classification of 45 FK506-binding proteins. *Proteins* 72: 197-208.
- Söderberg M.A., Cianciotto N.P.** (2008): A *Legionella pneumophila* peptidyl-prolyl cis-trans isomerase present in culture supernatants is necessary for optimal growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1634-1638.
- Sousa C. P.** (2006): The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 12: 363-373.
- Spencer S.C.** (1991): Electroporation technique of DNA transfection. *Methods Mol Biol.* 7: 45-52.
- Sperandio V., Torres A.G. and Kaper J.B.** (2002): Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel twocomponent regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 43: 809-821.
- Spiess M.** (1995): Heads or tails — what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett* 369: 76-79.
- Stahl S.J., Stewart K.R. and Williams F.D.** (1983): Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming. *J. Bacteriol.* 154: 930-937.
- Stamnes M.A., Shieh B.H., Chuman L., Harris G.L., Zuker C.S.** (1991): The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *Cell* 65: 219-227.
- Stanley N.R., Britton R.A., Grossman A.D., Lazazzera B.A.** (2003): Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* 185: 1951-1957.
- Stewart D.E., Sarkar A., Wampler J.E.** (1990): Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* 214: 253-260.

- Stewart P.S., Franklin M.J.** (2008): Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 199-210.
- Stockwell B.R., Schreiber S.L.** (1998): TGF-beta-signaling with small molecule FKBP12 antagonists that bind myristoylated FKBP12-TGF-beta type I receptor fusion proteins. *Chem. Biol.* 5: 385-395.
- Stoller G., Tradler T., Rücknagel J.U., Fischer G.** (1996): An 11.8 kDa proteolytic fragment of the *E. coli* trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *FEBS Lett* 384: 117-122.
- Strehmel J., Neidig A., Nusser M., Geffers R., Brenner-Weiss G., Overhage J.** (2015): Sensor Kinase PA4398 Modulates Swarming Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1274-1285.
- Stroud D.A., Meisinger C., Pfanner N., Wiedemann N.** (2010): Assembling the Outer Membrane. *Science* 328: 831-832.
- Stymest K. and Klappa P.** (2008): The periplasmic peptidyl prolyl cis–trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *FEBS Journal* 275: 3470-3479.
- Sun Q. and Margolin W.** (1998): FtsZ Dynamics during the Division Cycle of Live *Escherichia coli* Cells. *J. Bacteriol.* 180: 2050-2056.
- 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.
- Sydenham M., Douce G., Bowe F., Ahmed S., Chatfield S., Dougan G.** (2000): Salmonella enterica serovar typhimurium surA mutants are attenuated and effective oral vaccines. *Infect. Immun.* 68: 1109-1115.
- Sykes K., Gething M.J., Sambrook J.** (1993): Proline isomerases function during heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5853-5857.
- Tamayo R., Pratt J.T. and Camilli A.** (2007): Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 131-148.
- Terada T., Shirouzu M., Fukumori Y., Fujimori F., Ito Y., Kigawa T., Yokoyama S., Uchida T.** (2001). Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *J. Mol. Biol.* 305: 917-926.
- Thanedar S. and Margolin W.** (2004): FtsZ Exhibits Rapid Movement and Oscillation Waves in Helix-like Patterns in *Escherichia coli*. *Current Biology* 14: 1167-1173.
- Thapar R.** (2015): Roles of Prolyl Isomerases in RNA-Mediated Gene Expression. *Biomolecules* 5: 974-999.
- Thiele A., Krentzlin K., Erdmann F., Rauh D., Hause G., Zerweck J., Kilka S., Posel S., Fischer G., Schutkowski M., Weiwad M.** (2011): Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *J. Mol. Biol.* 411: 896-909.
- 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.
- Tong L.** (2013): Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol. Life Sci.* 70: 863-891.
- Tonthat N.K., Arold S.T., Pickering B.F., VanDyke M.W., Liang S.D., Lu Y. et al.** (2011): Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBOJ.* 30: 154-164.

- Tonthat N.K., Milam S.L., Chinnam N., Whitfill T., Margolin W. and Schumacher M.A.** (2013): SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110: 10586-10591.
- Tormo A., Almiron M., Kolter R.** (1990): *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J. Bacteriol.* 172: 4339-4347.
- Toyofuku M., Inaba T., Kiyokawa T., Obana N., Yawata Y. and Nomura N.** (2015): Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosc. Biotech. and Biochem.*
- Trandinh C.C., Pao G.M. and Saier M.H.** (1992): Structural and evolutionary relationships among the immunophilins: two ubiquitous families of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. *FASEB J.* 6: 3410-3420.
- Tremblay J. and Déziel E.** (2010): Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics.* 11: 587.
- Trivedi D.K., Ansari M.W., Tuteja N.** (2013): Multiple abiotic stress responsive rice cyclophilin: (OsCYP-25) mediates a wide range of cellular responses, *Commun. Integr. Biol.* 6: e25260.
- Trupkin S.A., Mora-Garcia S., Casal J.J.** (2012): The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant J.* 71: 712-723.
- Tsai C.M., Frasch C.E.** (1982): A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.
- Turner L., Zhang R., Darnton N.C., Berg H.C.** (2010): Visualization of flagella during bacterial swarming. *J. Bacteriol.* 192: 3259-3267.
- Typas A., Banzhaf M., van den Berg van Saparoea B., Verheul J., Biboy J., Nichols R.J. et al.** (2010): Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell* 143: 1097-1109.
- Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G., and Rahfeld, J. U.** (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.
- Uehara T., Parzych K.R., Dinh T. and Bernhardt T.G.** (2010): Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J* 29: 1412-1422.
- 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.
- Urech C., Koby S., Oppenheim A.B., Münchbach M., Hennecke H. and Narberhaus F.** (2000): Differential degradation of *Escherichia coli* s32 and *Bradyrhizobium japonicum* RpoH factors by the FtsH protease. *Eur. J. Biochem.* 267: 4831-4839.
- Ursell T.S., Nguyen J., Monds R.D., Colavin A., Billings G., Ouzounov N, et al.** (2014): Rod-like bacterial shape is maintained by feedback between cell curvature and cytoskeletal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 1025-1034.
- van den Ent F. and Lowe J.** (2000): Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J.* 19: 5300-5307.
- van den Ent F., Vinkenvleugel T.M., Ind A., West P., Veprintsev D., Nanninga N. et al.** (2008): Structural and mutational analysis of the cell division protein FtsQ. *Mol Microbiol* 68: 110-123.
- van der Horst A., Khanna K.K.** (2009): The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates cytokinesis through Cep55. *Cancer Res.* 69: 6651-6659.
- van der Horst A., Simmons J., Khanna K.K.** (2009): Cep55 stabilization is required for normal execution of cytokinesis. *Cell Cycle* 8: 3742-3749.
- van Houdt R., Michiels C.W.** (2005): Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microb.* 156: 626-633.

- van Houdt, R., Aertsen, A., Moons, P., Vanoirbeek, K. and Michiels, C.W.** (2006): *N*-Acyl-*L*-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 256: 83-89.
- van der Ploeg R., Verheul J., Vischer N.O., Alexeeva S., Hoogendoorn E., Postma M. et al.** (2013): Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*. Mol Microbiol.
- Vasudevan D., Fu A., Luan S., Swaminathan K.** (2012): Crystal structure of *Arabidopsis* cyclophilin38 reveals a previously uncharacterized immunophilin fold and a possible autoinhibitory mechanism. Plant Cell 24: 2666-2674.
- Veeraraghavan S., Holzman T.F. and Nall B. T.** (1996): Autocatalyzed protein folding. Biochem. 35: 10601-10607.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaer J., Vermant J. and Michiels J.** (2008): Living on a surface: swarming and biofilm formation. Trends Microbiol. 16: 496-506.
- 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.
- Vespa L., Vachon G., Berger F., Perazza D., Faure J.D., Herzog M.** (2004): The immunophilininteracting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. Plant Physiol. 134: 1283-1292.
- Venieraki A., Tjalgatidou P.Ch., Georgakopoulos D.G., Dimou M. and P. Katinakis** (2016): Swarming motility in plant-associated bacteria. Hellenic Plant Protection Journal 9: 16-27.
- Vitikainen M., Pummi T., Airaksinen U., Wu H., Sarvas M. and Kontinen V.P.** (2001): Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol 183: 1881-1890.
- Vitikainen M., Lappalainen I., Seppala R., Antelmann H., Boer H., Taira S., Savilahti H., HeckerM., Vihinen M., Sarvas M. and Kontinen V.P.** (2004): Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 279: 19302-19314.
- Vittorioso P., Cowling R., Faure J.D., Caboche M., 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.
- Vollmer W., Joris B., Charlier P. and Foster S.** (2008): Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. FEMS Microbiol Rev 32: 259-286.
- Voulhoux R., Bos M.P., Geurtsen J., Mols M., Tommassen J.** (2003): Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. Science 299: 262-265.
- Vuong P., Bennion D., Mantei J., Frost D. and Misra R.** (2008): Analysis of YfgL and YaeT Interactions through Bioinformatics, Mutagenesis, and Biochemistry. J. Bacteriol. 190: 1507-1517.
- Wagner A.** (2005a): Distributed robustness versus redundancy as causes of mutational robustness. BioEssays. 27: 176-188.
- Wang L., Lutkenhaus J.** (1998): FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. J. Mol. Biol. 29: 731-740.
- Wang L., Wang C.H., Jia J.F., Ma X.K., Li Y., Zhu H.B., Tang H., Chen Z.N., Zhu P.** (2010): Contribution of cyclophilin A to the regulation of inflammatory processes in rheumatoid arthritis. J. Clin. Immunol. 30: 24-33.
- Wang L., Yang F., Zhang D., Chen Z., Xu1, Knud R.M., Nierhaus H., Gong W. and Qin Y.** (2012): A conserved proline switch on the ribosome facilitates the recruitment and binding of trGTPases. Nature Structural & Molecular Biology 19 (4).

- Wang P., Cardenas M.E., Cox G.M., Perfect J.R., Heitman J.** (2001): Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*. EMBO Rep. 2: 511-518.
- Wang P. and Heitman J.** (2005): The cyclophilins. Genome Biology 6: 226.
- 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.
- Wang Q., Suzuki A., Mariconda S., Porwollik S., Harshey R.M.** (2005): Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. EMBO J. 24: 2034-2042.
- Wang Q., Freund S.M.V. and Löwe J.** (2012): FtsA forms actin-like protofilaments, Piotr Szwedziak. EMBO J. 1-12.
- Wang S., Fleming R.T., Westbrook E.M., Matsumura P., Mc Kay D.B.** (2006): Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. J. Mol. Biol. 355: 798-808.
- Wang X., Huang J., Mukherjee A., Cao C., Lutkenhaus J.** (1997): Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. J. Bacteriol. 179: 5551-5559.
- Wang Y., Liu C., Yang D., Yu H. and Liou Y.C.** (2010): Pin1At Encoding a Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Regulates Flowering Time in Arabidopsis. Molecular Cell 37: 112-122.
- Ward J.E. and Lutkenhaus J.** (1985): Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. Cell 42: 941-949.
- Webb H.M., Ruddock L.W., Marchant R.J., Jonas K. and Klappa P.** (2001): Interaction of the Periplasmic Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerase SurA with Model Peptides. J. Biol. Chem. 276: 45622-45627.
- Weber H., Pesavento C., Possling A., Tischendorf G. and Hengge R.** (2006): Cyclic-di-GMP-mediated signaling within the sS network of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 62: 1014-1034.
- 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.
- 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.
- Weiss D.S.** (2015): Last but not least: new insights into how FtsN triggers constriction during *Escherichia coli* cell division. Mol. Microbiol. 95: 903-909.
- 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.
- Whiteley M., Bangerla M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P.** (2001): Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 413: 860-864.
- Wilson C.G.M., Magliery T.J. and Regan L.** (2004): Detecting protein-protein interactions with GFP-fragment reassembly. Nature Methods 1: 255-262.
- Wilson M. (2001): Bacterial biofilms and human disease. Sci. Prog. 84: 235-254.

- Winkler J., Seybert A., König L., Pruggnaller S., Haselmann U., Sourjik V., Weiss M., Frangakis A.S., Mogk A., Bukau B.** (2010): Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO J.* 29: 910-923.
- Wolfe A.J., Visick K.L.** (2008): Get the message out: cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* 190: 463-475.
- Wood T.K.** (2009): Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environmental Microbiology* 11: 1–15.
- Wright K.J., Seed P.C., Hultgren S.J.** (2007): Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell.Microbiol.* 9: 2230-2241.
- Wu X., Wilcox C.B., Devasahayam G., Hackett R.L., Arévalo-Rodríguez M., Cardenas M.E., Heitman J., Hanes S.D.** (2000): The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.* 19: 3727-3738.
- Wulf G., Finn G. Suizu F. and Lu K.P.** (2005): Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat. Cell. Biol.* 7: 435-441.
- Wulf G.M., Ryo A., Wulf G.G., Lee S.W., Niu T., Petkova V., Lu K.P.** (2001): Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* 20: 3459-3472.
- Wülfing C., Lombardero J., Plückthun 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.
- Xu X., Wang S., Hu Y.X., Mc Kay D.B.** (2007): The periplasmic bacterialmolecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *J. Mol. Biol.* 373: 367-381.
- Xu Y.X. and Manley J.L.** (2007): The Prolyl Isomerase Pin1 Functions in Mitotic Chromosome Condensation. *Molecular Cell* 26: 287-300.
- Yang D.C., Peters N.T., Parzych K.R., Uehara T., Markovski M. and Bernhardt T.G.** (2011): An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 1052-1060.
- Yang H., Chen J., Yang J., Qiao S., Zhao S., Yu L.** (2007): Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 763-767.
- 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.
- Yang L., Barken K.B., Skindersoe M.E., Christensen A.B., Givskov M., Tolker-Nielsen T.** (2007): Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153: 1318-1328.
- Yu X., Tran A.H., Sun Q. and Margolin W.** (1998): Localization of Cell Division Protein FtsK to the *Escherichia coli* Septum and Identification of a Potential N-Terminal Targeting Domain. *J. Bacteriol.* 180: 1296-1304.
- Yu Y., Li Y., Huang G., Meng Z., Zhang D., Wei J., Yan K., Zheng C., Zhang L.** (2011): *P<sub>w</sub>HAP5*, a CCAAT-binding transcription factor, interacts with *P<sub>w</sub>FKBP12* and plays a role in pollen tube growth orientation in *Picea wilsonii*. *J. Exp. Bot.* 62: 4805-4817.
- Yura T. and Nakahigashi K.** (1999): Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 153-158.

- Zhang D., Liu G., Xue J., Lou J. Nierhaus K.H., Gong W. and Qin Y.** (2012): Common chaperone activity in the G-domain of trGTPase protects L11–L12 interaction on the ribosome. *Nucleic Acids Research* 1-15.
- Zhang J.W., Butland G., Greenblatt J.F., Emili A., Zamble D.B.** (2005): A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 4360-4366.
- 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.
- Zobel C.E.** (1943): The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46: 39-56.





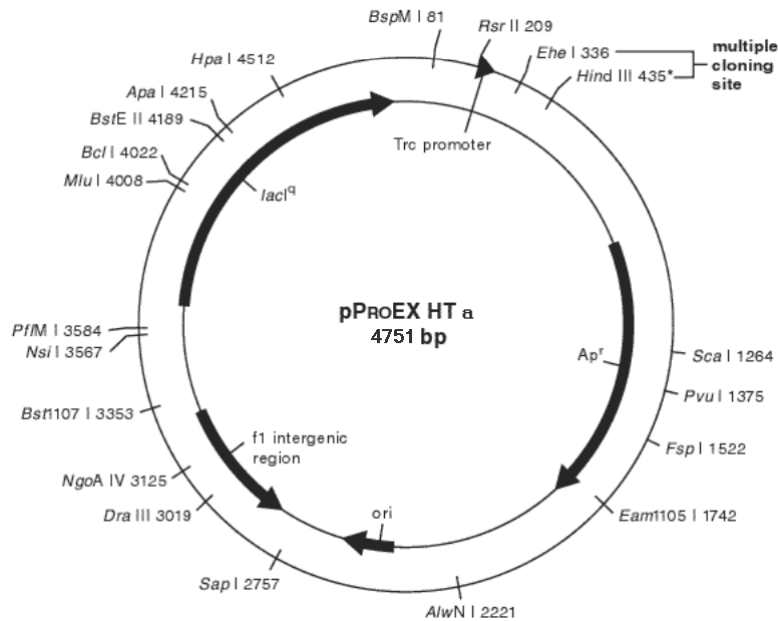
## **ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**



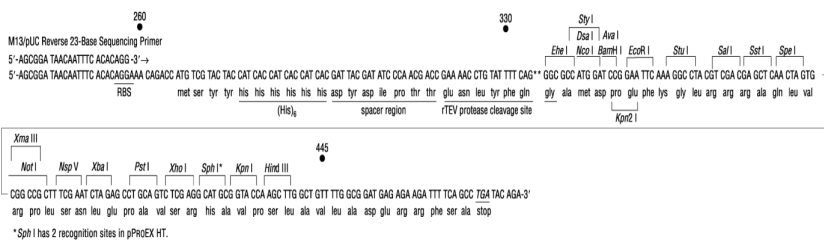
## ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Πλασμιδιακοί φορείς :

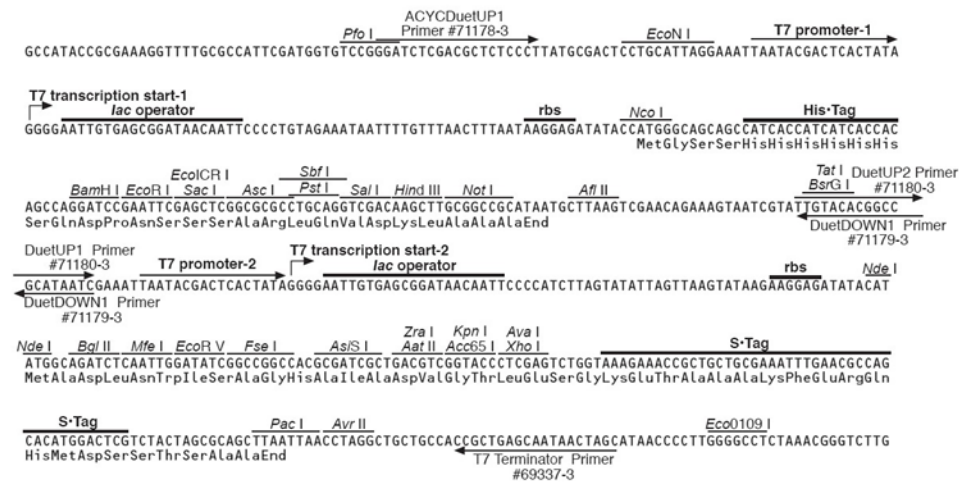
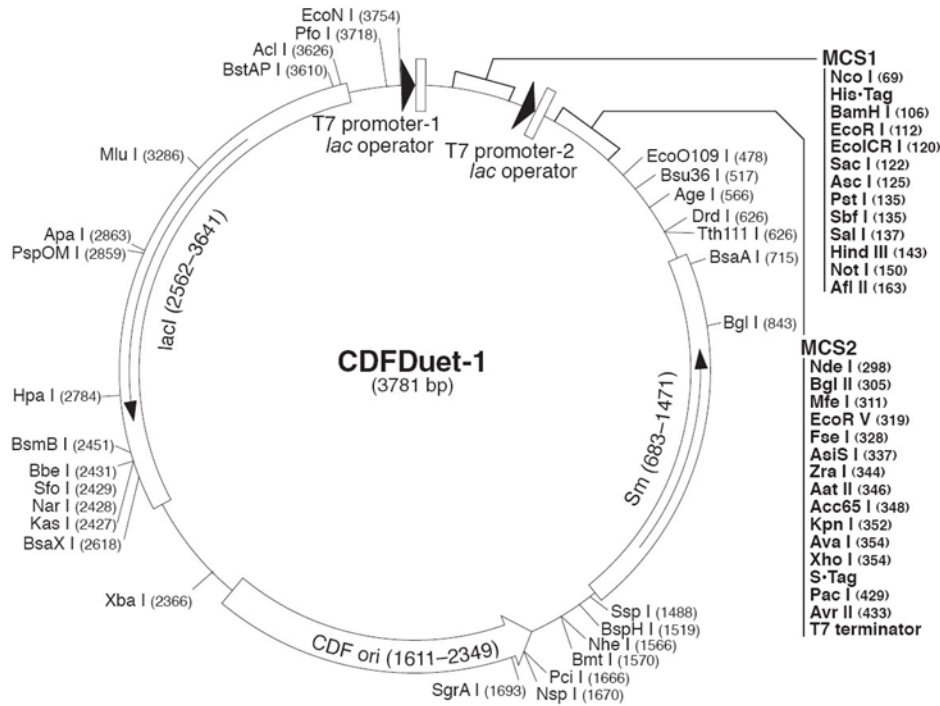
#### I. Ο πλασμιδιακός φορέας pPROEX.Hta:



#### pPROEX HTa multiple cloning site and primer binding region: 235-482

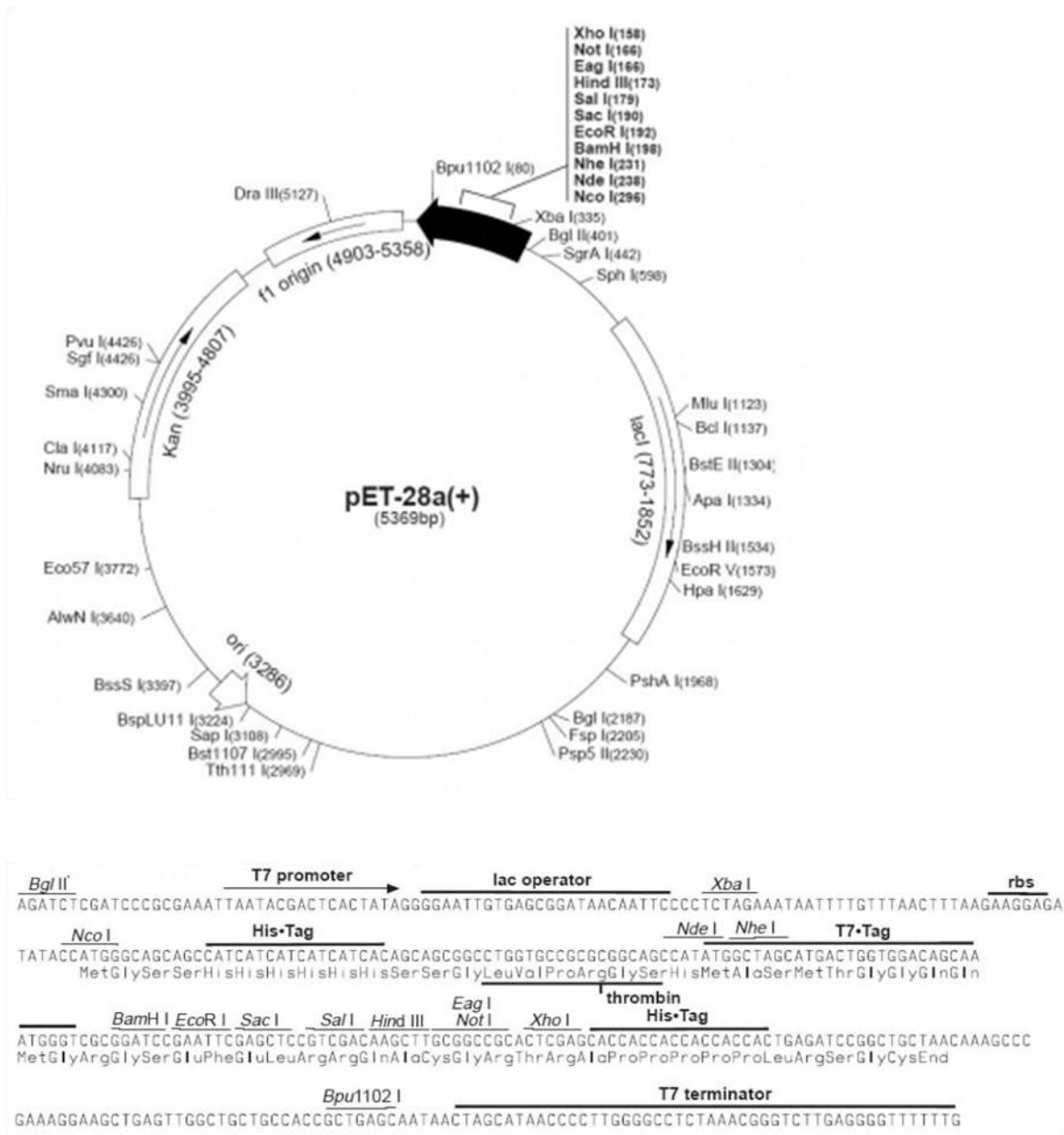


II. Ο πλασμιδιακός φορέας pCDFDuet-1:



pCDFDuet-1 cloning/expression regions

III. Ο πλασμιδιακός φορέας pET-28a:



**IV. Ο πλασμιδιακός φορέας pCA24N:**