

Κατασκευή εξειδικευμένων βακτηριακών στελεχών  
που επιτυγχάνουν την παραγωγή ανασυνδυασμένων  
μεμβρανοπρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις

ΕΛΕΝΗ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
"ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ"  
Ινστιτούτο Βιο-καινοτομίας

2023

### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

**Γεώργιος Σκρέτας (επιβλέπων)**

Διευθυντής Ινστιτούτου Βιο-καινοτομίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών  
«Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

**Καλλιόπη Παπαδοπούλου (συν-επιβλέπουσα)**

Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δημήτριος Χατζηνικολάου**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών

### **Επταμελής εξεταστική επιτροπή**

**Γεώργιος Σκρέτας (επιβλέπων)**

Διευθυντής Ινστιτούτου Βιο-καινοτομίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών  
«Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

**Καλλιόπη Παπαδοπούλου (συν-επιβλέπουσα)**

Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δημήτριος Χατζηνικολάου**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών

**Δημήτριος Καρπούζας**

Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δημήτριος Λεωνίδας**

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Γεώργιος Διαλλινάς**

Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Σωτήριος Βασιλειάδης**

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΛΕΝΗ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

Κατασκευή εξειδικευμένων βακτηριακών στελεχών που επιτυγχάνουν την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδασκόντων» (Αριθμός Υποτροφίας: 961)



Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας



ΕΛΕΝΗ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

2023

Κατασκευή εξειδικευμένων βακτηριακών στελεχών που επιτυγχάνουν την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών  
«Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Αριθμός εισαγωγικών σελίδων: 24

Αριθμός συνολικών σελίδων: 235

Αριθμός Πινάκων: 8

Αριθμός Εικόνων: 42

Αριθμός Παραρτημάτων: 2

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 202

## Περίληψη

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν βασικά συστατικά που εντοπίζονται στις βιολογικές μεμβράνες όλων των ζωντανών οργανισμών. Συμμετέχουν σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών ζωτικής σημασίας, όπως για παράδειγμα στην μεταγωγή σημάτων, στην διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης ή στην μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, ιόντων και άλλων μορίων διαμέσου της αυτής. Η σημασία τους υπογραμμίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι κωδικοποιούνται από το 20-30 % του συνόλου των γονιδίων κάθε οργανισμού, ενώ η διαταραχή της σωστής αναδίπλωσης και της εύρυθμης λειτουργίας τους εμπλέκεται σε ένα πλήθος σοβαρών ασθενειών, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ, η κυστική ίνωση ή ο καρκίνος. Λόγω των πολλαπλών και σημαντικών λειτουργιών τους, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν στόχο για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη θεραπευτικών μορίων, ενώ μέχρι στιγμής περισσότερες από τις μισές φαρμακευτικές ουσίες που κυκλοφορούν στην αγορά στοχεύουν σε έναν τέτοιο πρωτεϊνικό παράγοντα. Η πλήρης κατανόηση τόσο της δομής όσο και της λειτουργίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών προϋποθέτει την διαθεσιμότητα μεγάλων ποσοτήτων απομονωμένων πρωτεϊνών καλής ποιότητας, για την διεξαγωγή όλων των απαραίτητων δομικών και βιοχημικών μελετών. Δεδομένου ότι οι ποσότητες των μεμβρανικών πρωτεϊνών που απαντώνται εγγενώς στα φυσικά κύτταρα είναι κατά κανόνα εξαιρετικά χαμηλές, είθισται οι πρωτεΐνες να απομονώνονται μετά από υπερέκφραση σε ετερόλογους οργανισμούς-ξενιστές.

Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί έναν από τους ιστορικά προτιμώμενους οργανισμούς-ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων υδατοδιαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ωστόσο, η βακτηριακή υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών συνοδεύεται συχνά από φαινόμενα έντονης τοξικότητας και χαμηλής παραγωγικότητας που οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα τελικής βιομάζας και μειωμένη συσσώρευση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε αυτή την κατεύθυνση, στο παρελθόν κατασκευάστηκε ένα βακτηριακό στέλεχος, το SuptoxR, το οποίο υπερεκφράζει την RraA, μια πρωτεΐνη-αναστολέα της αποδομητικής δράσης της RNάσης E του

*E. coli*, και ανθίσταται στην κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα παράγει σημαντικά αυξημένες ποσότητες ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, κατασκευάστηκε μια σειρά νέων βακτηριακών στελεχών με βάση το SuptoxR.

Αρχικά, αναζητήθηκαν φυσικές παραλλαγές της RraA που εκφράζονται στα γονιδιώματα πρωτεοβακτηρίων και σε χλωροπλάστες φυτών και οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοιες ή βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με αυτές της *E. coli* RraA που υπερεκφράζεται στο στέλεχος SuptoxR. Οι επιλεγμένες παραλλαγές αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αυξάνουν τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας και ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στις βακτηριακές μεμβράνες. Βρέθηκε ότι εκτός από την αρχική RraA του *E. coli*, υπάρχει ένα πλήθος ομόλογων RraA πρωτεϊνών οι οποίες είναι εξίσου αποτελεσματικές στην προώθηση της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, δύο εξ' αυτών, οι RraA από τους οργανισμούς *Proteus mirabilis* και *Providencia stuartii* βρέθηκαν ότι ξεπερνούν σε αποδόσεις την *E. coli* RraA του SuptoxR. Έτσι, αναπτύχθηκαν δύο νέα βακτηριακά στελέχη δεύτερης γενιάς, τα SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, τα οποία μπορούν και καταπολεμούν την τοξικότητα που επάγεται από την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών ενώ ταυτόχρονα παράγουν μεγάλες ποσότητες σωστά αναδιπλωμένων και λειτουργικών μεμβρανικών πρωτεϊνών που έχουν εισαχθεί στην βακτηριακή μεμβράνη.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε το κατά πόσο βακτηριακά στελέχη που εκφράζουν παραλλαγές της RNάσης E, από την οποία έχουν απαλείφει τμήματα της C-τελικής της περιοχής και έχουν μειωμένη ριβονουκλεολυτική ικανότητα, μπορούν επίσης να ενισχύσουν την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε σύγκριση με κύτταρα που εκφράζουν την αγρίου τύπου ενδονουκλεάση, με τρόπο που προσομοιάζει τις συνθήκες υπερέκφρασης του αναστολέα της, της RraA. Ορισμένα από τα στελέχη που μελετήθηκαν και εξέφραζαν συγκεκριμένες γενετικές

απαλοιφές, αύξησαν σημαντικά την απόδοση της υπερέκφρασης ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, ενώ το βακτηριακό στέλεχος που έφερε την συγκεκριμένη μεταλλαγή RneΔ22, βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό καθώς αυξάνει σημαντικά τα τελικά επίπεδα ανάπτυξης της καλλιέργειας και ταυτόχρονα ενισχύει τη συσσώρευση ενός εύρους ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης, ξεπερνώντας σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά λόγο για την παραγωγή τέτοιων πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, και σε αναλογία με το αρχικό *E. coli* στέλεχος SuptoxR, το στέλεχος που εκφράζει τη συγκεκριμένη παραλλαγή της RNάσης E, ονομάστηκε SuptoxRNE22. Συνολικά, τα τρία νέα στελέχη που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη μπορούν να αποτελέσουν βιοτεχνολογικά εργαλεία ευρείας εφαρμογής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποδοτικά στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων μεμβρανικών πρωτεϊνών καλής ποιότητας, κατάλληλων για περαιτέρω βιοχημικές και δομικές μελέτες.

**Λέξεις κλειδιά:** *Escherichia coli*, παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, τοξικότητα, RraA, RNάση E, SuptoxR, SuptoxR2.1, SuptoxR2.2, SuptoxRNE22

## Abstract

Membrane proteins (MPs) are major structural and functional components of cell membranes in all living organisms, where they perform numerous important functions, such as maintenance of structural integrity, signaling or transport of nutrients, ions, and small molecules. Their crucial role is highlighted by the fact that they are encoded by 20-30 % of genes, both within prokaryotes and eukaryotes, while their proper folding and function are involved in a wide variety of diseases such as Alzheimer's disease, cystic fibrosis, or cancer. Due to their multiple and important functions MPs are high-priority targets for drug development, and up to now, more than half of all known pharmaceuticals target such proteins. The detailed understanding of both MP structure and function requires the availability of significant amounts of isolated protein of high quality, to perform all the necessary structural and biochemical studies. Since MP natural abundance is usually very low, the amounts needed are typically obtained through recombinant overexpression in heterologous host.

*Escherichia coli* is one of the most widely utilized host-organisms for the recombinant production of soluble and membrane proteins. Bacterial MP production, however, is usually accompanied by severe toxicity and low-level volumetric accumulation leading to low levels of final biomass and reduced accumulation of recombinant MPs in the cell membrane. Towards this direction, a bacterial strain, termed SuptoxR, was previously constructed. In this strain, co-expression of RraA, an inhibitor of the mRNA degrading activity of *E. coli* RNase E, can efficiently suppress the MP-induced toxicity, and simultaneously significantly enhance the cellular accumulation of membrane-incorporated recombinant MPs. Based on SuptoxR, a series of novel bacterial strains with further improved properties were developed, following two different strategies.

In the first part, naturally occurring variants of RraA were searched within genomes of proteobacteria and plant chloroplasts. The selected variants were evaluated for their toxicity-suppressing and MP production-promoting effects, compared to the original *E. coli* RraA of

SuptoxR. It was found that a number of these homologous RraA proteins also suppressed MP-induced cytotoxicity and enhanced the accumulation of MPs, and more importantly, co-expression of the RraAs from *P. mirabilis* and *P. stuartii*, frequently outperformed the MP-enhancing capabilities of *E. coli* SuptoxR. Thus, two second-generation *E. coli* SuptoxR strains were developed, termed SuptoxR2.1 and SuptoxR2.2, that overexpress the RraAs from *P. mirabilis* and *P. stuartii*, respectively. These new strains often achieved even further increased accumulation of well-folded, recombinant MPs compared to the original SuptoxR strain.

The second part involved the evaluation of a set of previously generated *E. coli* strains that carry specific deletions in parts of the C-terminal domain of RNase E and exhibit reduced ribonucleolytic activity, for their ability to suppress the toxicity which is caused by MP-overexpression process and to enhance recombinant MP-productivity, in a manner resembling the conditions of RraA overexpression in *E. coli* SuptoxR. Some of these strains that encoded specific RNase E truncation variants, resulted in significantly enhanced levels of recombinant MP production. Among these, the *E. coli* strain expressing Rne $\Delta$ 22 mutation, suppressed efficiently the MP-induced cytotoxicity and achieved greatly enhanced levels of recombinant MP production of both prokaryotic and eukaryotic origin, while it also performed better than the commercially available bacterial strains, which are frequently utilized for recombinant MP production. This specific strain, in analogy to the original SuptoxR, termed SuptoxRNE22. Overall, the new strains presented here may become broadly applicable biotechnological tools for the production of recombinant MPs in bacteria, as their use enables the production of recombinant MPs of high quality and quantity, suitable for functional and structural studies.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Recombinant membrane protein production, toxicity, RraA, RNase E, SuptoxR, SuptoxR2.1, SuptoxR2.2, SuptoxRNE22

## Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

**Vasilopoulou, E.,** Giannakopoulou, A., Kapsalis, C., Michou, M., Michoglou-Sergiou, A., Kolisis, F. N., & Skretas, G. (2022). Second-Generation *Escherichia coli* SuptoxR Strains for High-Level Recombinant Membrane Protein Production. *ACS Synthetic Biology*, 11(8), 2599–2609.

**Vasilopoulou, E.,** Chroumpi, T., Skretas, G. (2023). *Escherichia coli* strains with precise domain deletions in the ribonuclease RNase E can achieve greatly enhanced levels of membrane protein production. *Protein Science* (Accepted after minor revisions)

## Συμμετοχή σε συνέδρια

**Vasilopoulou E.,** Gialama D., Michou M., Skretas G. (2023) Development of a series of *Escherichia coli* strains for high-level recombinant membrane protein production. 11<sup>th</sup> Conference on Recombinant Protein Production, Girona, Spain (oral presentation)

**Βασιλοπούλου Ε.,** Γιαννακοπούλου, Α., Καψάλης, Χ., Μίχου, Μ., Μίχογλου-Σεργίου, Α., Κολίσης, Φ.Ν., Σκρέτας, Γ. (2022). SuptoxR & SuptoxR2.0: Εξειδικευμένα βακτηριακά στελέχη για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις. 13ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Πάτρα (προφορική παρουσίαση)

**Vasilopoulou, E.,** Gialama, D., Michou, M., Kapsalis, C., Michoglou-Sergiou, A., Kolisis, N. F., Skretas, G. (2022). SuptoxR and SuptoxR2.0: Specialized *Escherichia coli* strains for recombinant membrane protein production at high yields. 9ο Διεθνές Συνέδριο Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρίας Μικροβιόκοσμος, Αθήνα, Ελλάδα. (poster presentation)

**Vasilopoulou, E.,** Giannakopoulou, A., Gialama, D., Michou, M., Kapsalis, C., Michoglou-Sergiou, A., Kolisis, N. F., Skretas, G. (2022). SuptoxR and SuptoxR2.0: Specialized *Escherichia coli* strains for recombinant membrane protein production at high yields. 71ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα, Ελλάδα. (poster presentation)

**Vasilopoulou, E.,** Gialama, D., Michou, M., Giannakopoulou, A., Skretas, G. (2019). SuptoxR & SuptoxR2.0: Two specialized *Escherichia coli* strains for high-level recombinant membrane protein production. 70ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα, Ελλάδα. (poster presentation)

**Vasilopoulou, E.,** Gialama, D., Michou, M., Giannakopoulou, A., Skretas, G. (2019). SuptoxR-An engineered *Escherichia coli* strain that enables recombinant production of membrane proteins at high yields. EMBO Workshop: Tools for Structural Biology of Membrane Proteins, EMBL Hamburg, Germany. (poster presentation)

**Vasilopoulou, E.,** Gialama, D., Giannakopoulou, A., Skretas, G. (2019). SuptoxR-An engineered *Escherichia coli* strain that enables recombinant production of membrane proteins at high yields. FEBS Advanced Lecture Course. Biosystem Computational and Experimental Approaches, Spetses Island, Greece (poster presentation)

## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διεξήχθη στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και στο Ινστιτούτο Βιο-καινοτομίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», σε συνεργασία με το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Δρ. Γεώργιου Σκρέτα, στο διάστημα των ετών 2018-2023. Υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδασκόντων» (Αριθμός Υποτροφίας: 961). Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε επίσης από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας. Υποστηρίχτηκε επιπλέον από το έργο «Synthetic Biology: from omics technologies to genomic engineering (OMIC-ENGINE)» με κωδικό ΟΠΣ «MIS 5002636», το οποίο έχει ενταχθεί στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΠΑνΕΚ), στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών ιδιαίτερα σημαντική για την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών, καθώς αποτελούν βασικά δομικά και λειτουργικά συστατικά των βιολογικών τους μεμβρανών. Η μελέτη αυτών των μορίων με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην πάροδο των χρόνων, καθώς η επίτευξη λεπτομερούς γνώσης της δομής και των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους μπορεί να εφαρμοστεί σε τομείς όπως η ιατρική, η φαρμακευτική και η βιοτεχνολογία. Ταυτόχρονα όμως, εμφανίζονται σημαντικές προκλήσεις που δυσχεραίνουν την

προσπάθεια αυτή. Ενδεικτικό της σημασίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών αλλά και της δυσκολίας της μελέτης τους, είναι η απονομή του βραβείου Νόμπελ χημείας για την επίτευξη της πρώτης κρυσταλλικής δομής μεμβρανικής πρωτεΐνης το 1988, για το δομικό και μηχανιστικό χαρακτηρισμό καναλιών ιόντων και για την ανακάλυψη των καναλιών νερού το 2003, και για μελέτες του τρόπου δράσης υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G το 2012.

Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί έναν από τους ιστορικά προτιμώμενους οργανισμούς-ξενιστές για την ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η διαδικασία όμως της βακτηριακής υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών συνοδεύεται συχνά από φαινόμενα έντονης κυτταροτοξικότητας και χαμηλής παραγωγικότητας. Στο παρελθόν, κατασκευάστηκε το βακτηριακό στέλεχος SuptoxR, το οποίο μέσω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης RraA του *E. coli*, επιτυγχάνεται η έκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζεται η ανάπτυξη *E. coli* στελεχών δεύτερης γενιάς με βάση τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του SuptoxR. Τα νέα αυτά στελέχη αποδείχθηκε ότι μπορούν και ανθίστανται στην τοξικότητα που επάγεται συχνά κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών αυξάνοντας την τελική βιομάζα, ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν σημαντικά τα επίπεδα συσσώρευσης σωστά αναδιπλωμένων και λειτουργικών μεμβρανοπρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης στις βακτηριακές μεμβράνες.

## Ευχαριστίες

Ο πρώτος άνθρωπος στον οποίο οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ είναι ο επιβλέπωντάς μου, Γεώργιος Σκρέτας, διευθυντής του Ινστιτούτου Βιο-καινοτομίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Τον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής, για τη συνεχή καθοδήγησή του, τις πολύτιμες και εύστοχες συμβουλές του σε κάθε βήμα της εργασίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τη συν-επιβλέπουσα Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καλλιόπη Παπαδοπούλου καθώς και το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής μου, τον Δημήτριο Χατζηνικολάου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την καθοδήγηση, τον χρόνο που διέθεσαν, τα σημαντικά σχόλια και τις πολύτιμες συμβουλές τους, σε όλη την πορεία της διδακτορικής έρευνας. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τους Καθηγητές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δημήτριο Καρπούζα, Δημήτριο Λεωνίδα, τον Καθηγητή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γεώργιο Διαλλινά, και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σωτήριο Βασιλειάδη, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην Εξεταστική μου επιτροπή.

Οφείλω επίσης ένα ειλικρινές ευχαριστώ σε όλα τα παλιά και νέα μέλη του εργαστηρίου που συνεργαστήκαμε στη διάρκεια αυτών των χρόνων, για τη βοήθεια, την υποστήριξη και την δημιουργία ενός καθημερινού όμορφου κλίματος μέσα στο εργαστήριο. Θα ήθελα συγκεκριμένα να ευχαριστήσω τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Μυρσίνη Μίχου, Δάφνη Δεληβοριά και Δήμητρα Ζαραφέτα που με καθοδήγησαν με όρεξη και υπομονή στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, αλλά επίσης με ενέπνευσαν και με βοήθησαν ουσιαστικά σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας με τις πολύτιμες συμβουλές τους, καθώς και τον Δρ. Χαράλαμπο Καψάλη, τον Άρη Μίχογλου και την Δρ. Τάνια Χρούμπη για τη συνεργασία στο

πλαίσιο των πειραμάτων, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και τη στήριξή τους, που με βοήθησαν στην επίτευξη των επιστημονικών μου στόχων. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Σπύρο Ζωγράφο και τα μέλη του εργαστηρίου του για την διάθεση εργαστηριακού εξοπλισμού. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη, υπεύθυνη της Μονάδας Πρωτεομικής Ανάλυσης του ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», για την εκτέλεση των πειραμάτων φασματοσκοπίας μάζας και την ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς επίσης και τους υπεύθυνους των μονάδων κυτταρομετρίας ροής που με βοήθησαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων μου, την Ευθυμία Πάππου στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και την Δρ. Σοφία Γραμμενούδη, στο ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου, που χωρίς την αγάπη και την καθημερινή τους στήριξη δεν θα ήταν εφικτό να φτάσω ως εδώ.

## Κατάλογος συντμήσεων

*E. coli*: *Escherichia coli*

*P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*

*P. stuartii*: *Providencia stuartii*

**RraA**: regulator of ribonuclease activity A

**RraB**: regulator of ribonuclease activity B

**EcRraA**: *Escherichia coli* RraA

**PmRraA**: *Proteus mirabilis* RraA

**PsRraA**: *Providencia stuartii* RraA

**RNάση E**: ριβονουκλεάση E (ribonuclease E)

**LB**: Luria-Bertani

**OD**: οπτική πυκνότητα (optical density)

**GPCR**: υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνες G (G protein-coupled receptor)

**BR2**: υποδοχέας της βραδυκινίνης 2 (bradykinin receptor 2)

**CB1**: Κεντρικός υποδοχέας κανναβινοειδών (Central cannabinoid receptor)

**CB2**: Περιφερειακός υποδοχέας κανναβινοειδών (Peripheral cannabinoid receptor)

**CLRN1**: μεμβρανική πρωτεΐνη όμοια με τατρασπανίνη (tetraspan-like membrane protein clarin-1)

**MscL**: υψηλής αγωγιμότητας κανάλι ιόντων του οργανισμού *Mycobacterium tuberculosis* (large conductance mechanosensitive ion channel)

**HtdR**: *Haloterrigena turkmenica* deltarhodopsin

**MdfA**: Multidrug efflux transporter

**GFP**: Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein)

**EGFP**: enhanced green fluorescent protein

**aTc**: anhydrotetracycline

**IPTG**: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

**SDS-PAGE**: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**PBS** Phosphate-buffered saline

**DDM**: n-dodecyl β-D-maltoside

**TBST**: Tris-buffered saline + 0.1% Tween-20

**PDB**: Protein Data Bank

**PVDF**: Polyvinylidene fluoride

**SEC**: Size-exclusion chromatography

**FSEC**: Fluorescence-detection size-exclusion chromatography

**s.e.m.**: Standard error of the mean

**NTD**: N-τελική περιοχή (N-terminal domain)

**CTD**: C-τελική περιοχή (C-terminal domain)

## Κατάλογος Εικόνων

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 1: Η λιπιδική διπλοστοιβάδα πάνω στην οποία ενσωματώνονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. ....                                                                                                                | 27 |
| Εικόνα 2 Διαφορετικοί τύποι μεμβρανικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες. ....                                                                                                              | 28 |
| Εικόνα 3: Παραδείγματα μεμβρανικών πρωτεϊνών με χαρακτηριστική διαμόρφωση α-έλικας και β-βαρελίου. ....                                                                                                         | 30 |
| Εικόνα 4: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα χαρακτηριστικών δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών φαρμακευτικής σημασίας. ....                                                                                                | 33 |
| Εικόνα 5: Ποσοστό φαρμάκων που στοχεύουν συγκεκριμένες οικογένειες πρωτεϊνών .....                                                                                                                              | 35 |
| Εικόνα 6: Διάγραμμα μοναδικών δομών πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank από το 1976 μέχρι σήμερα (δεδομένα από 01/06/2023). ....                                                               | 38 |
| Εικόνα 7: Διάγραμμα συνολικού αριθμού μεμονωμένων δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank για κάθε χρόνο μετά τη δημοσίευση της πρώτης δομής μεμβρανικής πρωτεΐνης το 1985. .... | 39 |
| Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της συν-μεταφραστικής στόχευσης μεμβρανικών πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη βακτηρίων.....                                                                                     | 49 |
| Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της δομής τους τετραμερούς της RNάσης E. ....                                                                                                                                  | 56 |
| Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που ενώνονται στην RNάση E για το σχηματισμό του αποικοδομοσώματος. ....                                                                                        | 59 |
| Εικόνα 11: Εμφάνιση τοξικότητας κατά την επαγωγή της έκφρασης της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. ....                                                                                                               | 68 |
| Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της μεμβρανικής πρωτεΐνης bradykinin receptor 2 (BR2), όπως παράγεται από τους πλασμιδιακούς φορείς pBAD30BR2-KanR (A) και pBAD30BR2-GFP (B) αντίστοιχα. ....                   | 69 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αναζήτησης πιθανών καταστολέων της επαγόμενης από τη BR2 κυτταροτοξικότητας στο γονιδίωμα του <i>E. coli</i> . ....                                                                                                   | 71  |
| Εικόνα 14: Καταστολή κυτταροτοξικότητας που επάγεται από την υπερέκφραση της BR2 κατά την υπερέκφραση των γονιδίων <i>djlA</i> ή <i>rraA</i> . ....                                                                                                                   | 73  |
| Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των βακτηριακών στελεχών SuptoxD και SuptoxR.....                                                                                                                                                                                     | 74  |
| Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του βακτηριακού στελέχους SuptoxD2.0.....                                                                                                                                                                                             | 83  |
| Εικόνα 17: Σύγκριση των ακολουθιών των ομόλογων RraA πρωτεϊνών που μελετήθηκαν σε σχέση με την RraA του <i>E. coli</i> .....                                                                                                                                          | 92  |
| Εικόνα 18: Η συνέκφραση της πλειοψηφίας των ομόλογων RraA πρωτεϊνών βακτηριακής και φυτικής προέλευσης καταστέλλει την τοξικότητα που επάγεται κατά την υπερέκφραση της χμιαϊκής μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP, αυξάνοντας τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας.....    | 93  |
| Εικόνα 19: Η συμπαραγωγή ορισμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών αυξάνει την παραγωγικότητα μεμονωμένων <i>E. coli</i> κυττάρων σε ενσωματωμένη στη μεμβράνη BR2-GFP. ....                                                                                                  | 94  |
| Εικόνα 20: Η συνέκφραση ομόλογων RraA πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη BR2-GFP οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της μεμβρανοπρωτεΐνης ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας σε επίπεδα όμοια ή και υψηλότερα σε σχέση με την RraA του <i>E. coli</i> .....                          | 96  |
| Εικόνα 21: Ανάλυση της μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP που παράγεται κατά τη συνέκφραση της PmRraA με ανίχνευση φθορισμού σε κλάσματα από χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....                                                                                              | 103 |
| Εικόνα 22: Η συνέκφραση ομόλογων RraA πρωτεϊνών βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης με τη μεμβρανοπρωτεΐνη CLRN1-GFP οδηγεί σε αύξηση της τελικής ανάπτυξης των καλλιεργειών καθώς και των επιπέδων συσσώρευσης της μεμβρανικής πρωτεΐνης στις κυτταρικές μεμβράνες..... | 107 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 23: Η συνέκφραση ομόλογων RraA πρωτεϊνών βακτηριακής προέλευσης αυξάνει τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας και την παραγωγή των ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών CB1-GFP και CB2-GFP.....                                                                                                                                                                                                                              | 110 |
| Εικόνα 24: Η συνέκφραση συγκεκριμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών προωθεί τα επίπεδα συσσώρευσης σωστά αναδιπλωμένης και λειτουργικής HtdR.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 113 |
| Εικόνα 25: Η έκφραση επιλεγμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών ενισχύει την παραγωγικότητα των βακτηριακών κυττάρων που συνεκφράζουν τις ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες MscL-GFP και MdfA-GFP.....                                                                                                                                                                                                                                        | 115 |
| Εικόνα 26: Συνοπτικό διάγραμμα που παρουσιάζεται η επίδραση της συνέκφρασης του συνόλου των ομόλογων <i>rraA</i> γονιδίων στην παραγωγικότητα ανά μονάδα όγκου καλλιέργειών στις οποίες εκφράζεται κάθε μια από τις επτά διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, σε σύγκριση με τα επίπεδα παραγωγής στα SuptoxR κύτταρα που συνεκφράζουν το γονιδίου <i>rraA</i> του <i>E. coli</i> ..... | 117 |
| Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση των <i>E. coli</i> στελεχών SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 118 |
| Εικόνα 28: Τα βακτηριακά κύτταρα SuptoxR δεύτερης γενιάς παράγουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα απομονωμένης λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 122 |
| Εικόνα 29: Χαρακτηριστικά των <i>E. coli</i> στελεχών SuptoxR, SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 τα οποία είναι εξειδικεύονται στην παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....                                                                                                                                                                                                                                                       | 124 |
| Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση της RNάσης E του <i>E. coli</i> και των διαφορετικών παραλλαγών που φέρουν γενετικές απαλοιφές σε τμήματα της C-τελικής περιοχής της, που χρησιμοποιήθηκαν. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 128 |
| Εικόνα 31: Στελέχη <i>E. coli</i> που εκφράζουν παραλλαγές της RNάσης E με γενετικές απαλοιφές στην C-τελική περιοχή, καταστέλλουν την επαγόμενη από την μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση κυτταροτοξικότητα και ενισχύουν τη συσσώρευση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.....                                                                                                                                                       | 134 |

|                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 32: Βακτηριακά κύτταρα που εκφράζουν την παραλλαγή RneΔ22 της RNάσης E αυξάνουν την παραγωγικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών CLRN1-GFP και MscL-GFP. ....                                                      | 138 |
| Εικόνα 33: <i>E. coli</i> κύτταρα που εκφράζουν την παραλλαγή RneΔ22 της RNάσης E αυξάνουν την παραγωγικότητα της ροδοψίνης HtdR. ....                                                                                | 140 |
| Εικόνα 34: Η συνέκφραση της πρωτεΐνης RraA σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22 δεν βελτιώνει περαιτέρω την υπερέκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης CLRN1-GFP. ....                                                        | 143 |
| Εικόνα 35: Η συνέκφραση της πρωτεΐνης RraA σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22 δεν βελτιώνει περαιτέρω την υπερέκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης MscL-GFP. ....                                                         | 144 |
| Εικόνα 36: Τα βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22 μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με διαφορετικά συστήματα πλασμιδίων/υποκινητών: ....                                                                              | 147 |
| Εικόνα 37: Εύρεση των μέγιστων επιπέδων έκφρασης της μεμβρανοπρωτεϊνικής χίμαιρας BR2-GFP από το πλασμίδιο pET-28a(+)-BR2-GFP με βάση την βέλτιστη συγκέντρωση L-ραμνόζης στα βακτηριακά κύτταρα Lemo21(DE3). ....    | 149 |
| Εικόνα 38: Τα <i>E. coli</i> SuptoxRNE22 κύτταρα ξεπερνούν σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. .... | 150 |
| Εικόνα 39: Σχηματική απεικόνιση του <i>E. coli</i> SuptoxRNE22 στελέχους, ....                                                                                                                                        | 151 |
| Εικόνα 40: Χρωματικός χάρτης συσχέτισης των γονιδίων που εκφράζονται στα διαφορετικά δείγματα σύμφωνα με την ανάλυση του συνόλου των παραγόμενων πρωτεϊνών. ....                                                      | 173 |
| Εικόνα 41: Διάγραμμα διαφορών του πρωτεϊνικού προφίλ <i>E. coli</i> κυττάρων MC1061 που εκφράζουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση του γονιδίου <i>rraA</i> . ....                  | 174 |
| Εικόνα 42: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών. Οι κόμβοι αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες και οι ακμές τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Η εικόνα έχει εξαχθεί από την βάση δεδομένων STRING. ....             | 176 |

## Κατάλογος Πινάκων

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Πίνακας 1: Φυσικές παραλλαγές της RraA που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στο πλαίσιο αυτής της ερευνητικής εργασίας .....                                                                                                                                                                   | 87  |
| Πίνακας 2: Μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών SuptoxR δεύτερης γενιάς.....                                                                                                                                                                | 105 |
| Πίνακας 3: Διαφορετικά δείγματα στα οποία αναλύθηκε το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται. <i>E. coli</i> κύτταρα MC1061 μετασχηματίστηκαν σε κάθε μια από τις εννέα διαφορετικές συνθήκες με το πλασμίδιο ή το συνδυασμό των πλασμιδίων που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα..... | 169 |
| Πίνακας 4: Γονίδια και πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση άνω-ρυθμίζεται σημαντικά κατά την συνέκφραση του γονιδίου <i>rraA</i> με την μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP. ....                                                                                                                       | 174 |
| Πίνακας 5: Γονίδια και πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση κάτω-ρυθμίζεται σημαντικά κατά την συνέκφραση του γονιδίου <i>rraA</i> με την μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP. ....                                                                                                                      | 177 |
| Πίνακας 6: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν .....                                                                                                                                                                                                                                | 187 |
| Πίνακας 7: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν .....                                                                                                                                                                                                                                         | 190 |
| Πίνακας 8: Πλασμδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν .....                                                                                                                                                                                                                                | 193 |

## Πίνακας περιεχομένων

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Εισαγωγή .....                                                                                                                    | 26 |
| 1.1. Η βιολογική μεμβράνη .....                                                                                                      | 26 |
| 1.2. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες .....                                                                                                  | 27 |
| 1.3. Η σημασία των μεμβρανικών πρωτεϊνών .....                                                                                       | 33 |
| 1.4. Η επικρατούσα κατάσταση και οι προκλήσεις ως προς την ανάλυση δομών<br>μεμβρανικών πρωτεϊνών .....                              | 36 |
| 1.5. Ετερόλογη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών .....                                                                                   | 39 |
| 1.6. Το βακτήριο <i>Escherichia coli</i> ως οργανισμός-ξενιστής για την υπερέκφραση<br>μεμβρανικών πρωτεϊνών .....                   | 43 |
| 1.7. Βιοσύνθεση μεμβρανοπρωτεϊνών στο βακτήριο <i>E. coli</i> .....                                                                  | 44 |
| 1.8. Εμφάνιση τοξικότητας κατά την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο ..                                                    | 50 |
| 1.9. Η αποδόμηση των μορίων mRNA στα βακτήρια .....                                                                                  | 51 |
| 1.10. Η ενδονουκλεάση RNάση E του <i>E. coli</i> .....                                                                               | 55 |
| 1.11. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαμεμβρανικών<br>πρωτεϊνών .....                                  | 60 |
| 1.12. Τα βακτηριακά στελέχη SuptoxD και SuptoxR .....                                                                                | 67 |
| 1.12.1. Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών SuptoxD και SuptoxR .....                                                                  | 69 |
| 1.12.2. Αποδοτικότητα των βακτηριακών στελεχών SuptoxD και SuptoxR ως προς τη<br>συγκέντρωση ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. .... | 74 |
| 1.12.3. Η πρωτεΐνη DjlA .....                                                                                                        | 76 |

|                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.12.4. Η πρωτεΐνη RraA .....                                                                                                                                                                                                                               | 78  |
| 1.12.5. Το εξελιγμένο βακτηριακό στέλεχος δεύτερης γενιάς SuptoxD2.0.....                                                                                                                                                                                   | 82  |
| 1.13. Σκοπός παρούσας εργασίας .....                                                                                                                                                                                                                        | 84  |
| 2. Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 .....                                                                                                                                                                                        | 86  |
| 2.1. Επιλογή και αξιολόγηση ομόλογων RraA πρωτεϊνών ως καταστολείς της επαγόμενης τοξικότητας κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και ενεργοποιητές της παραγωγής τους.....                                                                          | 86  |
| 2.2. Η συνέκφραση των RraA πρωτεϊνών από τους οργανισμούς <i>P. mirabilis</i> και <i>P. stuartii</i> οδηγεί συχνά σε περαιτέρω αυξήσεις της βακτηριακής παραγωγικότητας σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες σε σχέση με την RraA του <i>E. coli</i> . .... | 99  |
| 2.3. Κατασκευή των βελτιωμένων <i>E. coli</i> στελεχών δεύτερης γενιάς SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 .....                                                                                                                                                      | 116 |
| 3. Ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους SuptoxRNE22.....                                                                                                                                                                                                      | 126 |
| 3.1. Βακτηριακά κύτταρα που παράγουν γενετικές απαλοιφές της RNάσης E καταστέλλουν επιτυχώς την κυτταροτοξικότητα που επάγεται κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και ενισχύουν την παραγωγικότητα μεμβρανοπρωτεϊνών .....                          | 128 |
| 3.2. <i>E. coli</i> κύτταρα που εκφράζουν τη γενετική απαλοιφή RneΔ22 παρουσιάζουν ενισχυμένη παραγωγικότητα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης.....                                                                        | 135 |
| 3.3. Η συνέκφραση της RraA στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxRNE22 δεν ενίσχυσε περαιτέρω την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.....                                                                                                               | 141 |
| 3.4. Το <i>E. coli</i> στέλεχος SuptoxRNE22 μπορεί να αποτελέσει έναν ξενιστή ευρείας εφαρμογής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.....                                                                                                 | 145 |

|                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5. Το στέλεχος <i>E. coli</i> SuptoxRNE22 ξεπερνά σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται συχνά για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών ..... | 147 |
| 4. Συμπεράσματα – Συζήτηση .....                                                                                                                                                                  | 154 |
| 5. Τρέχουσες μελέτες και προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....                                                                                                                                    | 168 |
| 5.1. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται αυξημένη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση κατά την μείωση της δραστικότητας της RNάσης E....                                     | 168 |
| 5.2. Εφαρμογή μεθόδων κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών για την κατασκευή βελτιωμένων βακτηριακών στελεχών SuptoxR τρίτης γενιάς. ....                                                            | 179 |
| 5.3. Κατασκευή ενός πιο απλού και σταθερού βακτηριακού συστήματος υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών .....                                                                                        | 181 |
| 6. Υλικά και μέθοδοι.....                                                                                                                                                                         | 186 |
| 6.1. Χημικά και αντιδραστήρια .....                                                                                                                                                               | 186 |
| 6.2. Βακτηριακά στελέχη .....                                                                                                                                                                     | 187 |
| 6.3. Εύρεση και επιλογή φυσικών παραλλαγών της RraA.....                                                                                                                                          | 189 |
| 6.4. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης .....                                                                                                                                                 | 189 |
| 6.5. Υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών.....                                                                                                                                                       | 195 |
| 6.6. Απομόνωση μεμβρανών .....                                                                                                                                                                    | 196 |
| 6.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE).....                                                                                           | 196 |
| 6.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου απουσία αποδιατακτικών παραγόντων (native-PAGE) .....                                                                                      | 197 |
| 6.9. Ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού .....                                                                                                                                                         | 197 |

|       |                                                                                                                                                                  |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.10. | Ανάλυση ανοσοαποτυπωμάτων κατά western (western blot) .....                                                                                                      | 197 |
| 6.11. | Μέτρηση φθορισμού σε πλακίδια 96 θέσεων .....                                                                                                                    | 198 |
| 6.12. | Ανάλυση φθορισμού με χρήση κυτταρομετρίας ροής .....                                                                                                             | 199 |
| 6.13. | Απομόνωση και ποσοτικοποίηση της δέλτα-ροδοψίνης του οργανισμού<br><i>Haloterrigena turkmenica</i> (HtdR) από βακτηριακές μεμβράνες .....                        | 199 |
| 6.14. | Απομόνωση της ροδοψίνης HtdR με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και<br>χρωματογραφίας μοριακής διήθησης .....                                                    | 200 |
| 6.15. | Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με μέτρηση φθορισμού (FSEC) .....                                                                                                | 201 |
| 6.16. | Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....                                                                                                                           | 202 |
| 6.17. | Πρωτεομική ανάλυση .....                                                                                                                                         | 203 |
| 7.    | Παραρτήματα .....                                                                                                                                                | 205 |
| 7.1.  | Νουκλεοτιδικές ακολουθίες των ομόλογων <i>rraA</i> γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν και<br>οι αντίστοιχες αμινοξικές ακολουθίες που κωδικοποιούνται από αυτά: ..... | 205 |
| 7.2.  | Πλασμιδιακοί χάρτες .....                                                                                                                                        | 210 |
| 8.    | Βιβλιογραφικές αναφορές .....                                                                                                                                    | 217 |

# **Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>**

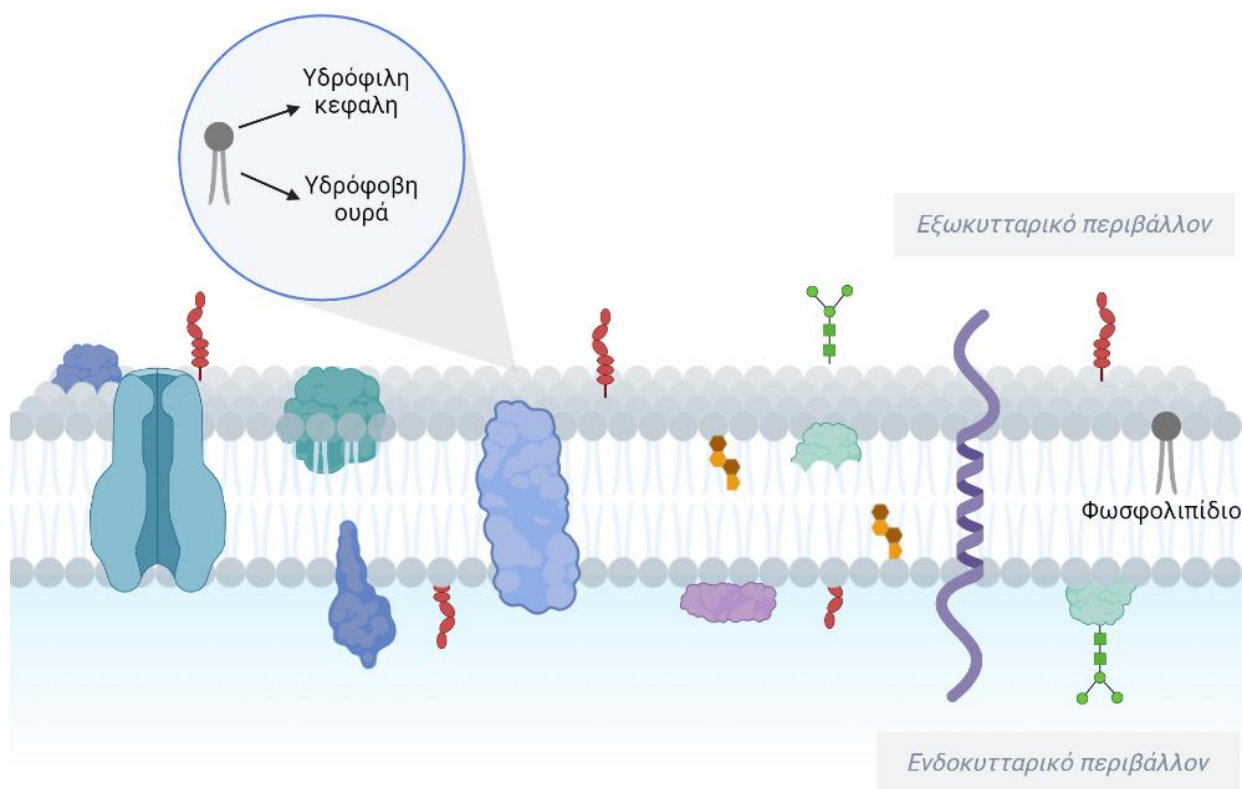
## **Εισαγωγή**

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Η βιολογική μεμβράνη

Οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούν μοριακούς σχηματισμούς που επιτρέπουν την ύπαρξη της ζωής με τη μορφή που τη γνωρίζουμε σήμερα, καθώς σχηματίζουν τα φυσικά όρια των κυττάρων ή των υποκυτταρικών οργανιδίων. Πρόκειται για έναν εξαιρετικά επιλεκτικό φραγμό, ο οποίος ελέγχει τις ουσίες που διέρχονται μέσω αυτού, ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται στη μεταγωγή και επεξεργασία σημάτων (Engelman, 2005). Προκειμένου να διαχωριστεί το εσωτερικό από το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον σε κάθε περίπτωση, οι μεμβράνες αυτές έχουν αναπτύξει τη δομή της λεγόμενης λιπιδικής διπλοστοιβάδας, αποτελούμενης από αμφιπαθή λιπίδια τα οποία διαθέτουν μια υδρόφιλη πολική κεφαλή που προσανατολίζεται στο εξωτερικό της μεμβράνης και δύο υδρόφοβες μη πολικές υδρογονανθρακικές ουρές που προσανατολίζονται αυθόρμητα στο εσωτερικό της (**Εικόνα 1**). Τα λιπίδια που απαντώνται στις μεμβράνες μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες όπως τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια ή οι στερόλες (π.χ. χοληστερόλη), ενώ στα βακτήρια κατά κύριο λόγο εντοπίζονται λιπίδια των δύο πρώτων κατηγοριών (Watson, 2015).

Η δομή των βιολογικών μεμβρανών ολοκληρώνεται με την ενσωμάτωση πρωτεϊνών διαφορετικών λειτουργιών στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, οι οποίες ονομάζονται μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η συνολική σύσταση της μεμβράνης σταθεροποιείται κυρίως με δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις van der Waals (Albers, 1999). Η λιπιδική σύσταση της μεμβράνης επηρεάζει διάφορα χαρακτηριστικά της όπως η ρευστότητα και η ευκαμψία, γεγονός που επηρεάζει με τη σειρά του και τη λειτουργικότητα των μεμβρανοπρωτεϊνών (Watson, 2015).



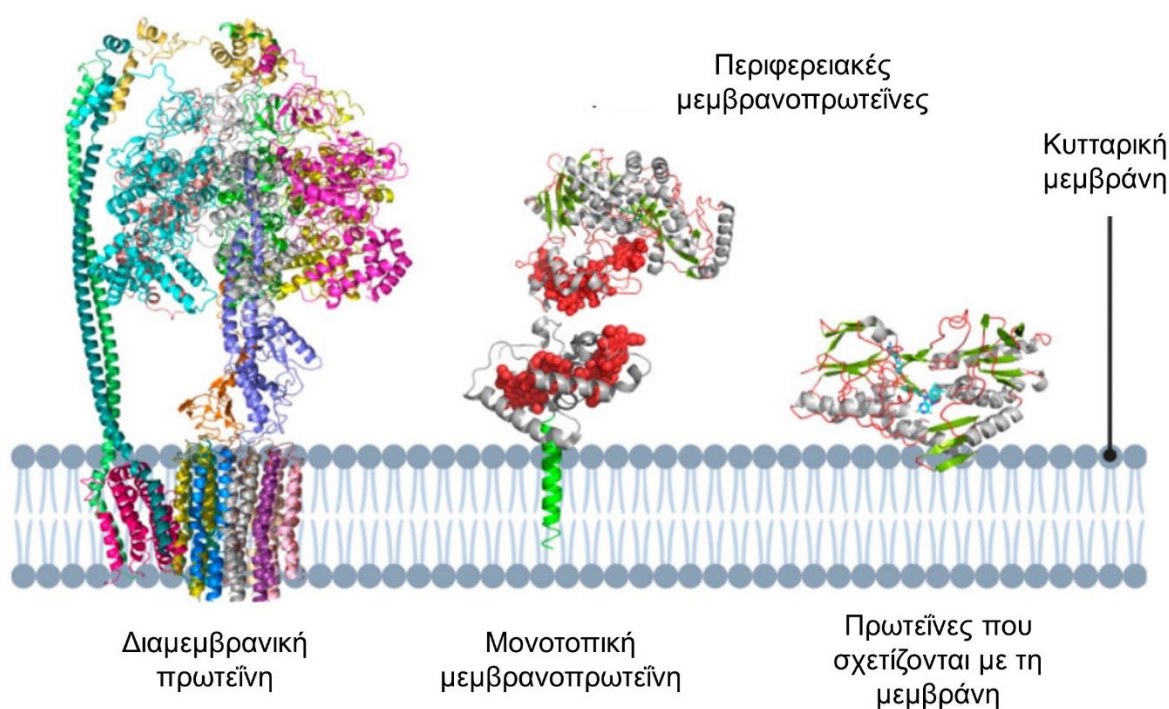
**Εικόνα 1:** Η λιπιδική διπλοστοιβάδα πάνω στην οποία ενσωματώνονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η δομή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας δημιουργείται από αμφιπαθή λιπίδια που διαθέτουν μια υδρόφιλη κεφαλή που προσανατολίζεται στο εξωτερικό της μεμβράνης και μια υδρόφιλη ουρά που λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων προσανατολίζονται στο εσωτερικό της (Η εικόνα δημιουργήθηκε στον ιστότοπο biorender.com).

## 1.2. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν μόρια που βρίσκονται ενσωματωμένα στις βιολογικές μεμβράνες και εκτελούν πολλαπλές λειτουργίες απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Παρόμοια με τη φύση των μεμβρανών, οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν υδρόφιλα τμήματα που αλληλεπιδρούν με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων καθώς και με το εξωτερικό υδατικό περιβάλλον στις δύο πλευρές της μεμβράνης, και υδρόφοβα τμήματα που οργανώνονται σε κατάλληλους σχηματισμούς και βρίσκονται στο εσωτερικό μη πολικό τμήμα της.

Ανάλογα με τη φύση της αλληλεπίδρασής τους με τη μεμβράνη, οι πρωτεΐνες αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (integral membrane proteins), οι οποίες

διαθέτουν ένα ή περισσότερα τμήματα που διαπερνούν πλήρως τη μεμβράνη, και β) τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη (membrane-associated proteins) οι οποίες μπορεί να είναι είτε περιφερειακές (peripheral membrane proteins) όταν ενώνονται εξωτερικά με τη μια πλευρά της λιπιδικής διπλοστοιβάδας μέσω ηλεκτροστατικών ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, είτε μονοτοπικές (monotopic membrane proteins) όταν διαθέτουν ένα υδρόφοβο τμήμα που εισέρχεται μερικώς στη μεμβράνη χωρίς να τη διαπερνά πλήρως (**Εικόνα 2**) (Boes et al., 2021).

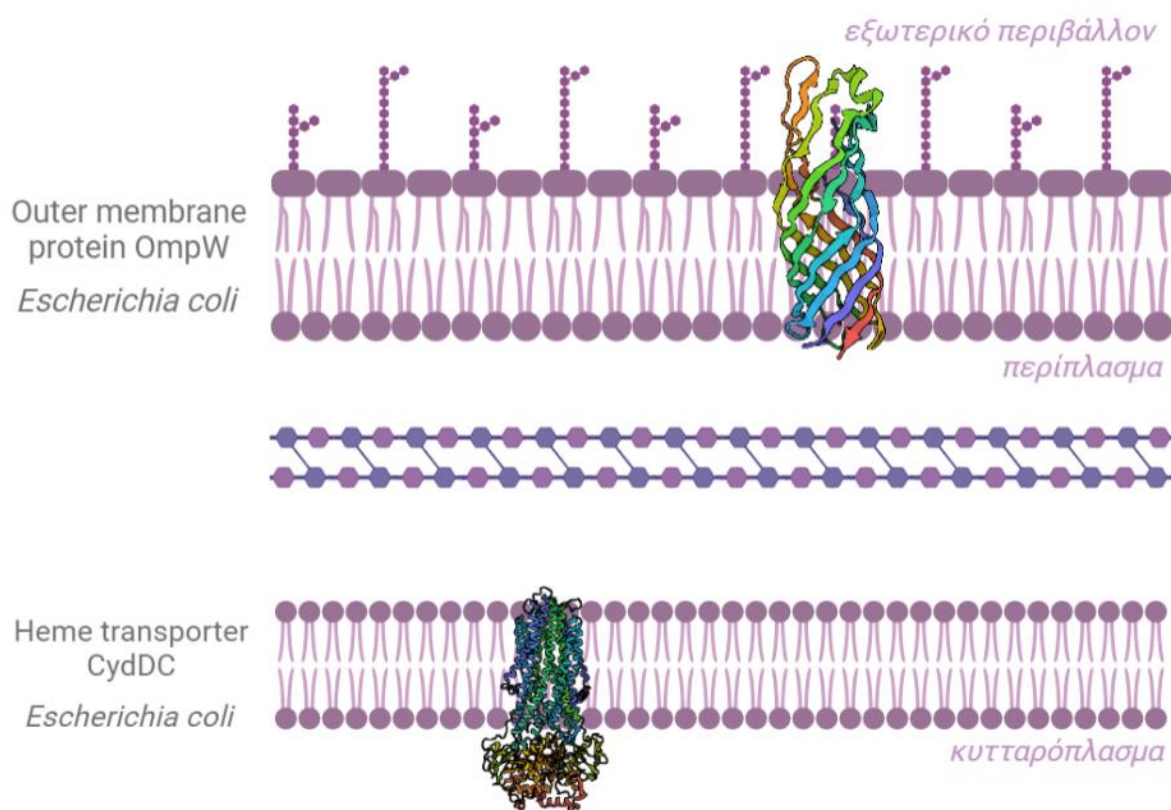


**Εικόνα 2 Διαφορετικοί τύποι μεμβρανικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες.** Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εμφανίζονται να διαπερνούν πλήρως τη μεμβράνη μια ή περισσότερες φορές (ως παράδειγμα χρησιμοποιήθηκε η συνθάση του ATP από τον οργανισμό *Escherichia coli*, PDB:5T4Q). Οι περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις πρωτεΐνες που απλώς σχετίζονται με τη μεμβράνη μέσω ηλεκτροστατικών ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (π.χ. η αφυδρογονάση NADH τύπου II από τον οργανισμό *Caldalkalibacillus thermarum*, PDB:6BDO), και στις πρωτεΐνες που αγκιστρώνονται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα χρησιμοποιώντας ένα υδρόφοβο τμήμα που δεν

διαπερνά ολόκληρη τη μεμβράνη (π.χ. η πρωτεΐνη NrfH του οργανισμού *Desulfovibrio vulgaris*, PDB:2J7A). (Προσαρμοσμένο σχήμα από (Boes et al., 2021)).

Καθώς στο εσωτερικό των μεμβρανών δεν υπάρχουν καθόλου μόρια νερού, τα τμήματα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που διαπερνούν τη μεμβράνη, υιοθετούν πολύ συγκεκριμένες διαμορφώσεις προκειμένου να διαθέτουν σταθερή δομή στο υδρόφοβο περιβάλλον τους. Η πιο συνηθισμένη δομική διαμόρφωση των διαμεμβρανικών τμημάτων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι αυτή της α-έλικας (alpha-helix) (White and Wimley, 1999), στην οποία τα πολικά σημεία των πεπτιδίων που συμμετέχουν στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων θάβονται στο εσωτερικό των σχηματισμών, ενώ οι μη πολικές πλευρικές αλυσίδες στρέφονται προς τη μεμβράνη (Schulz, 2002). Οι α-ελικοειδείς μεμβρανοπρωτεΐνες εντοπίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων και στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Διαθέτουν εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία καθώς μπορεί να έχουν από ένα μέχρι πάνω από είκοσι διαμεμβρανικά τμήματα, και αναλογικά με τη δομική τους ποικιλία εκτελούν πολλαπλές λειτουργίες όπως για παράδειγμα μετάδοση σημάτων, η μεταφορά ιόντων και μορίων μέσα από τη μεμβράνη ή η διατήρηση της δομικής της σταθερότητας (Taylor et al., 2006). Η εναλλακτική διαμόρφωση που υιοθετούν τα υδρόφοβα τμήματα των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι τα β-βαρέλια (beta-barrel) (Schulz, 2003) τα οποία σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ αντιπαράλληλων β πτυχωτών φύλλων και εντοπίζονται αποκλειστικά στην εξωτερική μεμβράνη Gram αρνητικών βακτηρίων, καθώς και σε ευκαρυωτικά οργανίδια προκαρυωτικής προέλευσης όπως τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες (Horne et al., 2020). Λειτουργούν ως παθητικοί, αλλά ειδικοί ως προς το υπόστρωμα, πόροι διάχυσης μικρών μορίων, αποτελούν τα σημεία πρόσδεσης ιών και συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η προσκόλληση σε άλλα κύτταρα, η έκκριση πρωτεϊνών στο περιβάλλον και ο σχηματισμός βιοφίλμ (von Heijne, 2007; Meuskens et al., 2017) (**Εικόνα 3**). Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτελούν οι πρωτεΐνες

με δομική διαμόρφωση  $\alpha$ -έλικας, οπότε από εδώ και στο εξής ο όρος μεμβρανικές πρωτεΐνες ή μεμβρανοπρωτεΐνες αντιστοιχεί αποκλειστικά σε αυτές.



**Εικόνα 3: Παραδείγματα μεμβρανικών πρωτεϊνών με χαρακτηριστική διαμόρφωση  $\alpha$ -έλικας και  $\beta$ -βαρελίου.** (πάνω) Τοπολογία της μεμβρανικής πρωτεΐνης OmpW της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου *E. coli* που υιοθετεί τη χαρακτηριστική διαμόρφωση  $\beta$ -βαρελίου (PDB 2F1V). (κάτω) Τοπολογία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CydDC από τον οργανισμό *E. coli* (PDB 8IPT). (Η εικόνα δημιουργήθηκε στον ιστότοπο biorender.com)

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το 20-30% του συνόλου των γονιδίων τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυώτικούς οργανισμούς (Wallin and von Heijne, 1998; Wagner et al., 2006). Το πλήθος και οι πολλαπλές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών, υπογραμμίζει τη σημασία τους για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αποτελούν βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία των μεμβρανών και χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για μια πληθώρα λειτουργιών όπως ο σχηματισμός και η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των μεμβρανών, η μεταφορά ιόντων, θρεπτικών στοιχείων και μεγαλύτερων μορίων όπως RNA και

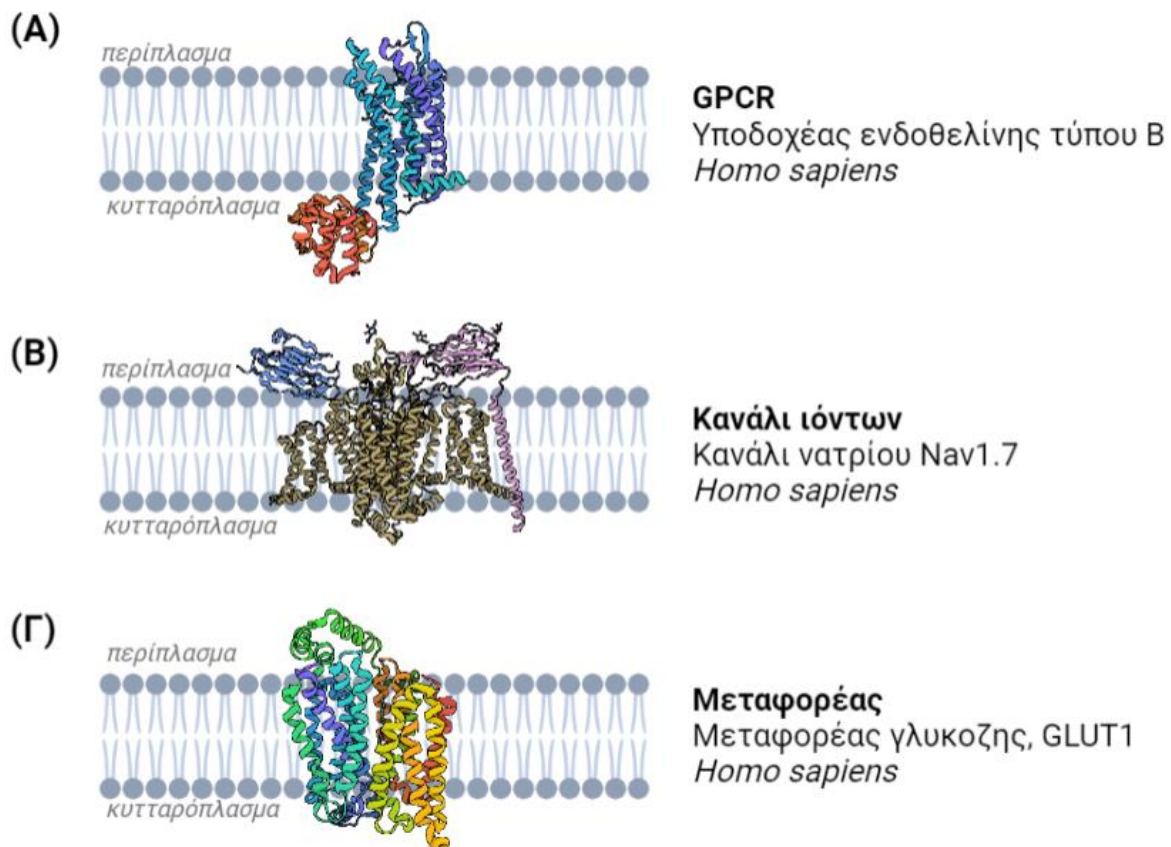
πρωτεΐνες μέσω της μεμβράνης, η αναγνώριση και η μεταβίβαση χημικών σημάτων, η πρόσδεση ενζύμων και πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα σημεία του κυττάρου κ.α. (von Heijne, 2007). Σύμφωνα, λοιπόν, με τη λειτουργία τους οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ταξινομούνται σε υποδοχείς (receptors), μεταφορείς (transporters) , κανάλια ιόντων ή νερού (channels) και ένζυμα (Εικόνα 4).

Οι υποδοχείς είναι εξειδικευμένα πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία ανιχνεύουν σήματα και προκαλούν αλλαγές στη λειτουργία του κυττάρου. Ουσιαστικά, λαμβάνονται από τους υποδοχείς χημικά σήματα μέσω της ένωσης εξωτερικών μορίων όπως ορμόνες, νευροδιαβιβαστές ή φαρμακευτικές ουσίες, τροποποιείται η διαμόρφωσή τους και τελικά μεταδίδεται το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα κύτταρα διαθέτουν πολλούς διαφορετικούς τύπους μεμβρανικών υποδοχέων που συνδέονται με συγκεκριμένα βιοχημικά και σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως για παράδειγμα οι υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (G-protein coupled receptors, GPCR), οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs), οι υποδοχείς του πυρήνα κ.α. (Gromiha and Ou, 2014). Συχνά οι διαθέτουν ομοιότητες στη δομή τους, γεγονός που διευκολύνει την κατηγοριοποίησή τους σε οικογένειες (Almeida et al., 2017).

Οι μεταφορείς αποτελούν περίπου το 10% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου και δημιουργούν ένα σύνολο αντλιών και καναλιών που καθορίζουν τη μοριακή σύσταση και την ενεργειακή του κατάσταση. Διαπερνούν τη μεμβράνη, προσδένουν μια συγκεκριμένη ουσία, και ύστερα από μια σειρά αλλαγών στη διαμόρφωσή τους, μεταφέρουν την ουσία αυτή κατά μήκος της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν και μεταφέρουν ένα πλήθος ουσιών, όπως για παράδειγμα θρεπτικά στοιχεία, παραπροϊόντα του μεταβολισμού, τοξικές ουσίες, μακρομόρια, ηλεκτρόνια ή μόρια σηματοδότησης από και προς το εσωτερικό των κυττάρων (Saier et al., 2021). Χαρακτηριστικό παράδειγμα πρωτεϊνών που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία αποτελεί η υπερικογένεια των μεταφορέων ABC οι οποίοι φέρουν κασέτες δέσμευσης ATP (ATP-binding cassette transporters) και μεταφέρουν ουσίες με κατανάλωση ενέργειας που προέρχεται από το

«ενεργειακό νόμισμα» ATP, καθώς και οι δευτερογενείς ενεργοί μεταφορείς (secondary active transporters) που καταλύουν τη μεταφορά μιας ουσίας αντίθετα στη βαθμίδα συγκέντρωσής της χρησιμοποιώντας την ηλεκτροχημική ενέργεια από ουσίες που συν-μεταφέρονται ή αντί-μεταφέρονται (Rees et al., 2009).

Τα κανάλια αποτελούν μια κατηγορία μεμβρανικών πρωτεϊνών που μπορούν να μεταφέρουν υδρόφιλες ουσίες όπως ιόντα (ion channels) ή νερό (aquaporins) μέσω της υδρόφοβης μεμβράνης με εκλεκτικό τρόπο και πιο γρήγορα σε σχέση με τους μεταφορείς. Τα κανάλια ιόντων διαθέτουν έναν πόρο ο οποίος γίνεται προσβάσιμος στα ιόντα ύστερα από αλλαγή της κατάστασης του καναλιού από κλειστό σε ανοιχτό με μικρές αλλαγές στη διαμόρφωσή του, οι οποίες προκαλούνται από ερεθίσματα όπως η αλλαγή του δυναμικού της μεμβράνης ή η δέσμευση μορίων-συνδετών (π.χ. ορμόνες) στο εξωτερικό ή εσωτερικό του κυττάρου, και τελικά μεταφέρουν τα ιόντα με ταχύτητες που μπορεί να φτάσουν έως και  $10^6$  ιόντα ανά δευτερόλεπτο. Τα μόρια αυτά είναι απαραίτητα για παράδειγμα σε σημεία όπως οι νευρώνες όπου απαιτείται η ταχεία ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης (B.S. Barker, 2017). Τα κανάλια νερού αποτελούν πόρους παθητικής διάχυσης νερού και μικρών μορίων, ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση στις πλευρές της μεμβράνης (Jung et al., 2021).



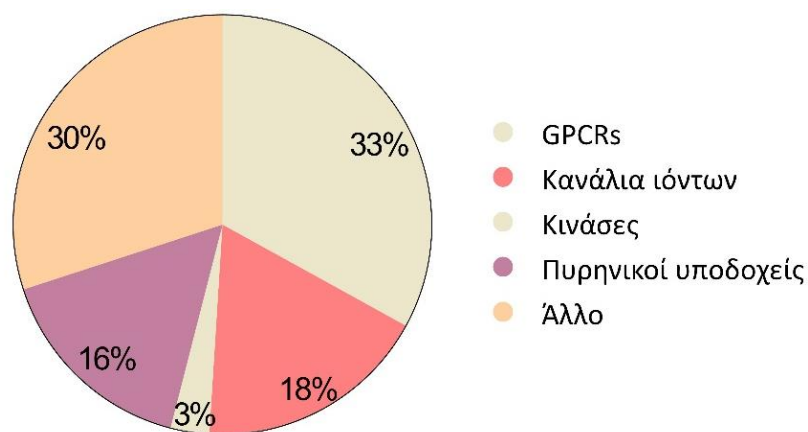
**Εικόνα 4: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα χαρακτηριστικών δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών φαρμακευτικής σημασίας.** (A) Ανθρώπινος υποδοχέας της ενδοθελίνης τύπου B (endothelin receptor type B, PDB 5GLI) , που ανήκει στην κατηγορία υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCR). (B) Ανθρώπινο κανάλι νατρίου που σχηματίζει 24 διαμεμβρανικές  $\alpha$ -έλικες και δημιουργεί σύμπλοκο με τις βοηθητικές υπομονάδες  $\beta 1$  και  $\beta 2$  (Nav1.7 ion channel, PDB 6J8J). (Γ) Ανθρώπινος μεταφορέας γλυκόζης GLUT1 (SLC glucose transporter GLUT1, PDB 4PYP). (Προσαρμοσμένο σχήμα από (Gulezian et al., 2021) που σχεδιάστηκε στον ιστότοπο biorender.com).

### 1.3. Η σημασία των μεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε, εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών διεργασιών ζωτικής σημασίας όπως για παράδειγμα η επικοινωνία, ο μεταβολισμός ή η μεταφορά μορίων, και συνεπώς η σωστή λειτουργία τους έχει μεγάλη σημασία για τη διατήρηση της υγείας των διάφορων οργανισμών. Στον άνθρωπο, η διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας τους μπορεί να οδηγήσει σε ένα πλήθος δυσλειτουργιών και

ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ανοσολογικές ή φλεγμονώδεις διαταραχές, καρδιαγγειακές ή μεταβολικές παθήσεις (π.χ. διαβήτης) καθώς και νευρολογικές ασθένειες (π.χ. νόσος Alzheimer) κ. α. (Gromiha and Ou, 2014; Liu et al., 2016).

Εξαιτίας των ιδιαίτερων λειτουργιών τους που σχετίζονται άμεσα με τη μετατροπή εξωγενών σημάτων σε ενδογενείς διεργασίες αλλά και της εύκολης προσβασιμότητας σε αυτές σε σχέση με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες καθώς προσεγγίζονται εύκολα από μικρά αλλά μεγαλύτερα μόρια, έχουν από χρόνια προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και ως εκ τούτου αποτελούν στόχο για πάνω από τις μισές φαρμακευτικές ουσίες που κυκλοφορούν στην αγορά (Overington et al., 2006). Μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες μεμβρανικών πρωτεϊνών που αποτελούν στόχο για σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι οι υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCRs). Αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ανθρώπου και εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών διεργασιών όπως ο για παράδειγμα ο μεταβολισμός και η επικοινωνία με το περιβάλλον, καθώς μετατρέπουν εξωτερικά ερεθίσματα σε ενδογενή σήματα (Yang et al., 2021). Λόγω του πλήθους και των λειτουργιών των GPCRs, περίπου το ένα τρίτο των κλινικά εγκεκριμένων φαρμάκων από τον οργανισμό Food and Drug Administration (FDA), επιτυγχάνει τη δραστηριότητά του μέσω αλληλεπίδρασης με κάποιον από τους υποδοχείς αυτής της οικογένειάς (Hauser et al., 2017; Santos et al., 2017).



**Εικόνα 5: Ποσοστό φαρμάκων που στοχεύουν συγκεκριμένες οικογένειες πρωτεϊνών** (Santos et al., 2017).

Επιπλέον, τα κανάλια ιόντων αποτελούν στόχο για περίπου 18% των εγκεκριμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων, και οι πυρηνικοί υποδοχείς για περίπου 16% (Santos et al., 2017). Παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων των οποίων η χρήση εγκρίθηκε στη διάρκεια του 2022 αποτελούν το Gefapixant που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του χρόνιου βήχα (στόχος το κανάλι ιόντων *P2RX3*), το Tirzepatide με χρήση κατά του διαβήτη τύπου II (στόχος ο GPCR *GIPR*) καθώς και το μονοκλωνικό αντίσωμα Spesolimab<sup>a</sup> που στοχεύει τον υποδοχέα της κυτοκίνης *IL36R* και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της γενικευμένης φλυκταινώδους ψωρίασης (Avram et al., 2023). Ακόμη, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται με έμμεσο τρόπο τόσο στην ιατρική όσο και στη βιομηχανία των φαρμάκων, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CDCP1 (CUB-containing domain protein 1) η οποία πρόσφατα εντοπίστηκε ως ένας πολλά υποσχόμενος διαγνωστικός βιοδείκτης για κακοήθεις όγκους (Qi et al., 2022), ή ως στόχοι για το σχεδιασμό μονοκλωνικών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, περισσότερα από τα μισά αντισώματα που έχουν εγκριθεί και κυκλοφορούν στην αγορά, τόσο στην Αμερική όσο και στην Ευρωπαϊκή Ένωση, στοχεύουν σε μεμβρανοπρωτεΐνες, με τη συντριπτική πλειοψηφία αυτών να στοχεύει σε πρωτεΐνες με ένα μικρό διαμεμβρανικό τμήμα (μόνο τρία από αυτά στοχεύουν σε μεγάλες πολύπλοκες πρωτεΐνες όπως οι GPCRs) (Salazar et al., 2021)

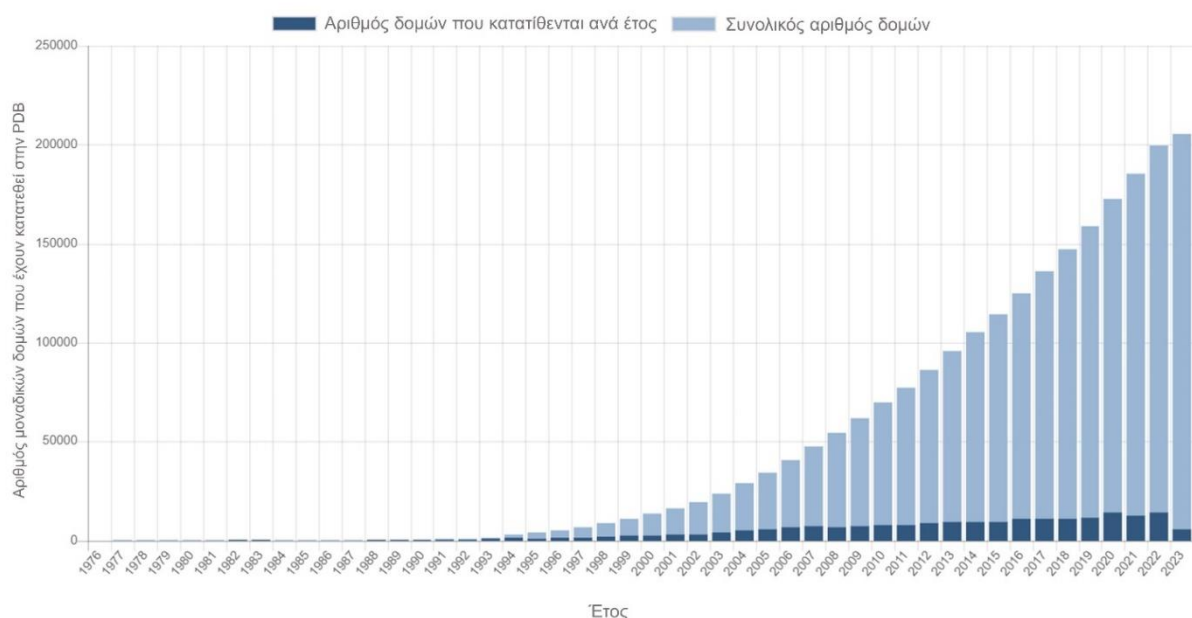
Οι μεμβρανοπρωτεΐνες έχουν επιπλέον προσελκύσει το ενδιαφέρον στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Συγκεκριμένα, μελετώνται και χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων στοχεύοντας στην εκμετάλλευση των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους να είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές και εκλεκτικές στην αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα μόρια. Οι μελέτες αυτές έχουν καταλήξει στη δημιουργία βιοαισθητήρων, όπου οι μεμβρανικές πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται από την εκάστοτε συσκευή ανίχνευσης καθώς ενώνονται σε αυτή είτε άμεσα, με την ενσωμάτωσή τους σε τεχνητή λιπιδική διπλοστοιβάδα, είτε έμμεσα με την ενσωμάτωση κυττάρων από διάφορους οργανισμούς στους οποίους έχει παραχθεί η μεμβρανοπρωτεΐνη ενδιαφέροντος (Misawa et al., 2018).

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω δεδομένα, αναδεικνύεται η ανάγκη για λεπτομερή και ακριβή γνώση τόσο της δομής όσο και της λειτουργίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών για ένα εύρος επιστημονικών πεδίων όπως η βιολογία, η ιατρική, η βιοτεχνολογία αλλά πρωτίστως η φαρμακευτική. Η πρόσβαση σε τρισδιάστατες δομές μεμβρανοπρωτεϊνών υψηλής ποιότητας οδηγεί στην κατανόηση της λειτουργίας τους και επιτρέπει τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων εκλεκτικών και αποτελεσματικών θεραπευτικών μορίων.

#### **1.4. Η επικρατούσα κατάσταση και οι προκλήσεις ως προς την ανάλυση δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών**

Η εξαιρετικά μεγάλη σημασία των μεμβρανικών πρωτεϊνών έχει αναγνωριστεί από την επιστημονική κοινότητα αλλά δεν αντικατοπτρίζεται στον αριθμό των γνωστών δομών μεμβρανοπρωτεϊνών που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής, σε σύγκριση με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Ιστορικά ο προσδιορισμός της δομής μεμβρανοπρωτεϊνών αποτελούσε, και αποτελεί ακόμα και σήμερα ως ένα βαθμό, πρόκληση, καθώς διακατέχεται από μια σειρά τεχνικών δυσκολιών που εμφανίζονται σε όλα τα στάδια της διαδικασίας, από την έκφραση του γονιδίου που παράγει την εκάστοτε πρωτεΐνη μέχρι την επίτευξη της τελικής της δομής (Choy et al.,

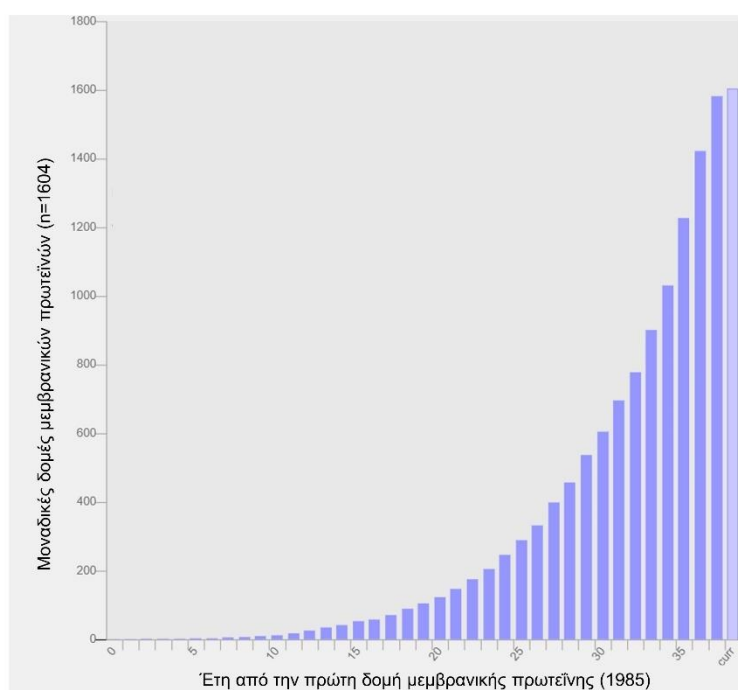
2021). Αρχικά, η ποσότητα μεμβρανικών πρωτεϊνών που παράγεται ανά κύτταρο στη φύση είναι κατά κανόνα ιδιαίτερα μικρή, ενώ η ετερόλογη υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών συνοδεύεται συχνά από φαινόμενα τοξικότητας, καθιστώντας έτσι δύσκολη την απόκτηση των ποσοτήτων που απαιτούνται για την εκτέλεση της περαιτέρω πειραματικής διαδικασίας (Bernaumat et al., 2011). Επιπλέον, ακόμη και στις περιπτώσεις που η ποσότητα των πρωτεϊνών που παράγεται είναι ικανοποιητική, η διαδικασία της εξαγωγής τους από την κυτταρική μεμβράνη και της απομόνωσής τους είναι απαιτητική, καθώς στο φυσικό τους περιβάλλον οι μεμβρανοπρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τα διαφορετικά λιπίδια της μεμβράνης, άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες καθώς επίσης και με άλλα ανόργανα ή μικρά οργανικά μόρια, δημιουργώντας έτσι ένα δυναμικό σύστημα που επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Jelokhani-Niaraki, 2022). Τέλος, η σταθερότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών όταν αυτές εξέρχονται από τη φυσική λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι συχνά χαμηλή, ιδιαίτερα στην περίπτωση των ευκαρυωτικών μεμβρανοπρωτεϊνών. Κάποιες λοιπόν από τις προκλήσεις που αντιμετωπίζονται είναι ο εντοπισμός των κατάλληλων συνθηκών έκφρασης, η επιλογή του συστήματος απομόνωσης των πρωτεϊνών (με χρήση επιφανειοενεργής ουσίας ή κάποιου άλλου συστήματος απομίμησης μεμβράνης) καθώς και ο προσδιορισμός μεθόδων αύξησης της σταθερότητας της μεμβρανοπρωτεΐνης (π.χ. μέσω συγκεκριμένων θερμοσταθεροποιητικών σημειακών μεταλλάξεων ή μέσω απαλοιφών τμημάτων της πρωτεΐνης), για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης και της σταθερότητας της στη διαδικασία της διαλυτοποίησής της (Arachea et al., 2012). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τον καθορισμό της δομής των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X (X-ray crystallography), η κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryogenic electron microscopy, cryo-EM) και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (nuclear magnetic resonance, NMR) (Almeida et al., 2017).



**Εικόνα 6: Διάγραμμα μοναδικών δομών πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank από το 1976 μέχρι σήμερα (δεδομένα από 01/06/2023).** Προσαρμοσμένο σχήμα από τα στατιστικά δεδομένα της PDB ( <https://www.rcsb.org/>).

Η δυσκολία στον προσδιορισμό της δομής των μεμβρανικών πρωτεϊνών αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι λιγότερο από 1% των δομών πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank (PDB), αντιστοιχεί σε μεμβρανοπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα από τις 205.451 συνολικά διαφορετικές δομές από το 1976 μέχρι σήμερα (**Εικόνα 6**), μόνο οι 1604 προέρχονται από μεμβρανικές πρωτεΐνες (δεδομένα μέχρι τον Ιούνιο 2023) (**Εικόνα 7**), ενώ στη διάρκεια του 2023 το ποσοστό είναι επίσης χαμηλό (22 στις 5777 δομές). Η πρώτη δομή μεμβρανικής πρωτεΐνης δημοσιεύτηκε το 1985 και αφορούσε την ανακάλυψη της τρισδιάστατης δομής του φωτοσυνθετικού κέντρου του οργανισμού *Rhodospseudomonas viridis* με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (Deisenhofer et al., 1985). Από τότε μέχρι σήμερα, υπάρχει μια διαρκής ενασχόληση και έρευνα στην κατεύθυνση της αντιμετώπισης των προαναφερθέντων προβλημάτων. Μέσα από σημαντικές τεχνολογικές εξελίξεις των τελευταίων ετών έχει επιτευχθεί βελτίωση των οπτικών συστημάτων των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων μετάδοσης (transmission electron microscopes) και των ανιχνευτών που έχουν βοηθήσει σημαντικά την

απομόνωση μεμβρανοπρωτεϊνών για δομικές αναλύσεις με τη μέθοδο της κρυοσκοπικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, στην οποία απαιτείται κατά κανόνα μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης (Bayburt and Sligar, 2010). Αποτέλεσμα της έρευνας αυτής, είναι η διευκόλυνση των δομικών αναλύσεων μεμβρανικών πρωτεϊνών που έχει οδηγήσει σε σαφή αύξηση της γνώσης της στερεοδιάταξής τους, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, αν και το περιθώριο βελτίωσης είναι ακόμα μεγάλο.



**Εικόνα 7:** Διάγραμμα συνολικού αριθμού μεμονωμένων δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank για κάθε χρόνο μετά τη δημοσίευση της πρώτης δομής μεμβρανικής πρωτεΐνης το 1985. Προσαρμοσμένο διάγραμμα από τη βάση δεδομένων του Dr. Stephen White (<https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>).

## 1.5. Ετερόλογη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Η ακριβής γνώση τόσο της δομής όσο και της λειτουργίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για μια πληθώρα βιοτεχνολογικών και βιοϊατρικών εφαρμογών όπως

για παράδειγμα ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μορίων ή η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν σε πολύπλοκες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Για την εκτέλεση όλων των απαραίτητων δομικών και βιοχημικών δοκιμών είναι απαραίτητη η πρόσβαση σε μεγάλες ποσότητες μεμβρανοπρωτεϊνών καλής ποιότητας. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η εγγενής παραγωγή τέτοιων πρωτεϊνών πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες στα κύτταρα των διαφόρων οργανισμών, είθισται οι απαιτούμενες ποσότητες να αποκτώνται ύστερα από ετερόλογη έκφραση σε οργανισμούς-ξενιστές. Επιπλέον, η ετερόλογη έκφραση επιτρέπει τη γενετική τους τροποποίηση με τέτοιο τρόπο ώστε να τις καθιστά πιο σταθερές και να διευκολύνει τη μετέπειτα ανίχνευση και απομόνωσή τους (Wagner et al., 2006). Για την ετερόλογη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται οργανισμοί όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, κύτταρα εντόμων ή θηλαστικών, ή διαγονιδιακά ζώα (Sarramegna et al., 2003). Καθώς η εύρεση ενός καθολικού συστήματος που θα είναι το πιο αποτελεσματικό στην έκφραση όλων των μεμβρανοπρωτεϊνών δεν είναι εφικτό, τουλάχιστον προς το παρόν, η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται με δοκιμές στα διαφορετικά συστήματα έκφρασης, σύμφωνα με τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους. Ενδεικτικά αναλύονται παρακάτω τα πιο δημοφιλή συστήματα μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης.

Οι ζυμομύκητες αποτελούν απλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και η χρήση τους ως οργανισμοί-ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών διαθέτει πλεονεκτήματα όπως εύκολες και οικονομικές συνθήκες καλλιέργειας, ευκολία στη γενετική τους τροποποίηση και δυνατότητα σχηματισμού μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ. δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, προσθήκη παλμιτικού οξέος σε αμινοξικά κατάλοιπα κυστεΐνης) (Roth et al., 2006; Bawa et al., 2011). Χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή ευκαρυωτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών μεσαίου μεγέθους, ενώ τα είδη που έχουν μελετηθεί περισσότερο και προτιμώνται στην πλειοψηφία των

περιπτώσεων είναι τα *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia pastoris*. Τα είδη αυτά χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά για την ετερόλογη παραγωγή μιας ΑΤΡάσης ασβεστίου από κουνέλι (Jidenko et al., 2005) και ενός ευκαρυωτικού καναλιού καλίου (Long et al., 2005), αντίστοιχα, το 2005, και από τότε αποτελούν αξιόπιστα συστήματα παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Παρά τα σημαντικά τους πλεονεκτήματα, η χρήση των ζυμομυκήτων για την ετερόλογη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι πιο χρονοβόρα και σύνθετη σε σχέση με τα πιο απλά προκαρυωτικά συστήματα, η ποιότητα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και ιδιαίτερα της γλυκοζυλίωσης διαφέρει σε σχέση με τους ανώτερους ευκαρυώτικους οργανισμούς, και οι διαφορές στο λιπιδικό προφίλ επηρεάζουν τη σωστή αναδίπλωση και τη σταθερότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών (Sethuraman and Stadheim, 2006; Hamilton and Zha, 2015; Kodedova and Sychrova, 2015).

Οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί-ξενιστές χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στις περιπτώσεις όπου η παρουσία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, η ποιότητα του λιπιδικού προφίλ και η φυσική αναδίπλωση της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι ζωτικής σημασίας για την εκάστοτε μελέτη. Τα δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα είναι κύτταρα εντόμων που έχουν προσβληθεί από συγκεκριμένα στελέχη βακουλίου και οι διαφορετικές σειρές κυττάρων θηλαστικών.

Ανά τα χρόνια, τα κύτταρα εντόμων αποτελούν ένα σύστημα που χρησιμοποιείται εκτενώς για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που προορίζονται τόσο για δομικές όσο και για λειτουργικές μελέτες (Yin et al., 2007). Κάποιες από τις πρωτεΐνες που έχουν εκφραστεί επιτυχώς σε αυτό το σύστημα ανήκουν στην κατηγορία των GPCRs (π.χ. ο β αδρενεργικός υποδοχέας, ο υποδοχέας της αδενοσίνης A2A, ο υποδοχέας D3 της ντοπαμίνης) (Chidiac et al., 1994; Sarramegna et al., 2003), των καναλιών (π.χ. P2X4, GluA2 και η ακουαπορίνη AQP4) (Hiroaki et al., 2006; Kawate et al., 2009; Sobolevsky et al., 2009) καθώς και των μεταφορέων ABC (π.χ. ABCG2 και ABCC4) (Ozvegy et al., 2001; Hardy et al., 2019).

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο προέρχονται από τις ωοθήκες των λεπιδόπτερων *Spodoptera frugiperda* (Sf9 και Sf21) και *Trichoplusia ni* (Hi5), και ο μετασχηματισμός τους πραγματοποιείται αξιοποιώντας τη φυσική ιδιότητα των βακιλοϊών να μολύνουν και να αναπαράγονται μέσα σε κύτταρα εντόμων. Επιμολύνοντας, λοιπόν, κυτταρικές σειρές με στελέχη βακιλοϊού, στου οποίου το γονιδίωμα έχει ενσωματωθεί το γονίδιο ενδιαφέροντος, μπορεί να πραγματοποιηθεί τελικά η ετερόλογη παραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών (Jarvis, 2009). Τα συστήματα αυτά, προτιμώνται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών λόγω της σχετικής ευκολίας στην καλλιέργεια σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές θηλαστικών, της δυνατότητας έκφρασης μεγάλων πρωτεϊνών σε σωστή αναδίπλωση και της δυνατότητας σχηματισμού μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Επιπλέον, είναι μια ασφαλής προσέγγιση ως προς το περιβάλλον, καθώς τα στελέχη βακυλοϊού που χρησιμοποιούνται μπορούν να μολύνουν μόνο τα κύτταρα της καλλιέργειάς (Ahn et al., 2008). Ωστόσο, η ετερόλογη έκφραση σε κύτταρα εντόμων έχει και ορισμένα μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος σε αναλώσιμα και εξοπλισμό, η χαμηλότερη απόδοση σε σχέση με τα μικροβιακά συστήματα, ο μεγαλύτερος χρόνος παραγωγής και η διαφορετική λιπιδική σύσταση σε σχέση με τα κύτταρα των θηλαστικών (Kesidis et al., 2020).

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών που προορίζονται για μια πληθώρα εφαρμογών, όπως λειτουργικές δοκιμές, μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων (Yin et al., 2007). Έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την παραγωγή σύνθετων πρωτεϊνών όπως GPCRs (π.χ. υποδοχέας της σεροτονίνης 5HT και ο μ-υποδοχέας οπιοειδών) και μεταφορείς ABC (π.χ. P-gp) (Andrell and Tate, 2013; Kesidis et al., 2020). Η πιο δημοφιλής κυτταρική σειρά είναι τα HEK 293 (human embryonic kidney cells), ενώ χρησιμοποιούνται επίσης τα BHK-21 (baby hamster kidney cells), COS-7 (monkey kidney fibroblast cells), CHO (Chinese hamster ovary cells) και τα καρκινικά HeLa. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που παράγονται σε αυτό το σύστημα είναι ως επί

το πλείστον σωστά αναδιπλωμένες, λειτουργικές και διαθέτουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ταυτόχρονα όμως η πρωτεϊνική υπερέκφραση σε κύτταρα θηλαστικών είναι πιο ακριβή, χρονοβόρα και μικρότερης αποδοτικότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα ενώ παρουσιάζει προβλήματα όταν επιχειρείται η παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα και είναι ευαίσθητη σε μολύνσεις (Junge et al., 2008).

## **1.6. Το βακτήριο *Escherichia coli* ως οργανισμός-ξενιστής για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών**

Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Το όνομά του προέρχεται από τον Γερμανό μικροβιολόγο Theodore Escherich, από τον οποίο ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Πρόκειται για έναν οργανισμό που εντοπίζεται φυσιολογικά στη χλωρίδα του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και είναι δυνητικά παθογόνο (Fratamico and Smith, 2006). Λόγω του γεγονότος ότι έχει πραγματοποιηθεί η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιωματικού DNA του βακτηρίου, της ευκολίας στο χειρισμό του και της ικανότητάς του να αναπτύσσεται σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς οργανισμούς για βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Allocati et al., 2013).

Αποτελεί επίσης τον μικροοργανισμό που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στο πεδίο της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, καθώς είναι ένας από τους ιστορικά προτιμώμενους οργανισμούς-ξενιστές για την υπερέκφραση υδατοδιαλυτών αλλά και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η χρήση του *E. coli* για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διαθέτει μια σειρά από πλεονεκτήματα. Αρχικά, πρόκειται για έναν οργανισμό που αναπτύσσεται με μεγάλη ταχύτητα και εύκολες συνθήκες καλλιέργειας, με χαμηλό κόστος. Επιπλέον, αποτελεί έναν από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους οργανισμούς για τον οποίο υπάρχουν διαθέσιμες λεπτομερείς

πληροφορίες ως προς το μεταβολισμό και τη φυσιολογία του, γεγονός που καθιστά το βακτήριο ένα πολύ σημαντικό εργαλείο της συνθετικής βιολογίας και της μεταβολικής μηχανικής. Τέλος, έχει αναπτυχθεί μια σειρά από αποτελεσματικά εργαλεία για τη γενετική του τροποποίηση, που οδηγούν σε πολύ υψηλή αποδοτικότητα κατά το μετασχηματισμό και σε υψηλό ρυθμό ανάπτυξης καλλιέργειας (Mathieu et al., 2019).

Το *E. coli* αποτελεί ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό σύστημα έκφρασης που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς από την επιστημονική κοινότητα για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Πράγματι, η έκφραση περίπου των μισών ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών από το 2010 έως το 2020 πραγματοποιήθηκε σε αυτόν τον οργανισμό-ξενιστή, ενώ το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί σε περίπου 13% για τις γνωστές δομές μεμβρανικών πρωτεϊνών ευκαρυωτικής προέλευσης (Kesidis et al., 2020). Επιπλέον, περίπου το 20% όλων των γνωστών δομών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που είχαν κατατεθεί στην Protein Data Bank και είχαν παραχθεί με ανασυνδυασμό μέχρι το 2018, προέρχονταν από πρωτεΐνες που είχαν εκφραστεί στο *E. coli* (Dilworth et al., 2018). Παρά τις δυσκολίες που παρουσιάζει η ετερόλογη έκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών στο *E. coli* (π.χ. απουσία δυνατότητας δημιουργίας ευκαρυωτικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, εμφάνιση τοξικότητας κατά την υπερέκφραση πρωτεϊνών), έχουν παραχθεί με επιτυχία και ευκαρυωτικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες φαρμακολογικής σημασίας, όπως για παράδειγμα ο μεταφορέας ABC Atm1 από τον οργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* (Srinivasan et al., 2014), ο ανθρώπινος υποδοχέας της αδενοσίνης A<sub>2a</sub> (Weiss and Grisshammer, 2002), ο υποδοχέας της νευροτενσίνης (Egloff et al., 2014), το μιτοχονδιακό κανάλι VDAC (Bayrhuber et al., 2008) κ.α.

### **1.7. Βιοσύνθεση μεμβρανοπρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli***

Στα βακτήρια, το σύνολο των πρωτεϊνών παράγεται στο κυτταρόπλασμα από τα ριβοσώματα και η λειτουργικότητά τους εξαρτάται από τη σωστή αναδίπλωση και τη μεταφορά τους στο

κατάλληλο σημείο του κυττάρου (Laursen et al., 2005). Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες είναι εμπλουτισμένες στην επιφάνειά τους με πολικά αμινοξέα, ενώ τα υδρόφοβα προστατεύονται στο εσωτερικό των διαμορφώσεων που σχηματίζονται (Schwartz and King, 2006). Έτσι, καθώς η σύνθεση και ο τελικός προορισμός λειτουργίας τους είναι συνήθως το ίδιο υποκυτταρικό διαμέρισμα, το κυτταρόπλασμα, το περιβάλλον στο οποίο θα πρέπει να δημιουργηθεί η τελική δομή δεν αλλάζει κατά της διάρκεια της μετάφρασης. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που θα πρέπει να μεταφερθούν αρχικά στην εσωτερική μεμβράνη και στη συνέχεια είτε να ενσωματωθούν σε αυτή, είτε να μεταφερθούν στο περίπλασμα, στην εξωτερική μεμβράνη ή στο εξωτερικό περιβάλλον, πρέπει να αναδιπλωθούν σωστά και να οδηγηθούν ασφαλώς στο ανάλογο τμήμα του κυττάρου (Adams et al., 2002). Συγκεκριμένα, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν εκτεθειμένα στην επιφάνειά τους κυρίως υδρόφοβα μη πολικά αμινοξικά κατάλοιπα, καθώς προορίζονται για ένθεση στο εσωτερικό των μεμβρανών όπου οι ουρές των λιπιδίων δημιουργούν ένα επίσης υδρόφοβο περιβάλλον (von Heijne, 2007). Προκειμένου να αποφευχθεί η συσσωμάτωση και η λανθασμένη αναδίπλωση των νέο-συντιθέμενων μεμβρανικών πρωτεϊνών που αναδύονται από το ριβόσωμα λόγω της παραμονής τους στο υδατικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν ιδιαίτερα ακριβή μηχανισμό για την άμεση αναγνώριση, την επεξεργασία και την ένθεσή τους στη μεμβράνη (Luirink et al., 2005).

Η μεταφορά πρωτεϊνών στον κυτταρικό φάκελο στο *E. coli* πραγματοποιείται μέσω τριών μηχανισμών: του μονοπατιού SRP (signal recognition particle), του μονοπατιού Sec (secretory pathway), και του μονοπατιού Tat (twin arginine translocation) (Green and Mecsas, 2016). Το πρώτο βήμα της αναγνώρισης και της σηματοδότησης της έναρξης της μεταφοράς στη μεμβράνη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, καθώς και κάποιων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω μιας υδρόφοβης αλληλουχίας-σήμα (signaling sequence), η οποία βρίσκεται στην N-τελική περιοχή της πρωτεΐνης που συντίθεται και εξέρχεται πρώτη από το

ριβόσωμα. Η αλληλουχία αυτή είναι διαφορετική για κάθε μονοπάτι, αναγνωρίζεται από τους αντίστοιχους μοριακούς παράγοντες κάθε μηχανισμού και στην περίπτωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών αποκόπτεται από την πολυπεπτιδική αλυσίδα όταν αυτές περάσουν την εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου (Green and Mecsas, 2016). Η πλειοψηφία των μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν διαθέτουν μια τέτοια αλληλουχία-σήμα, αλλά στοχεύονται στη μεμβράνη μέσω του σωματιδίου αναγνώρισης σήματος (SRP) που αναγνωρίζει συνήθως το πρώτο διαμεμβρανικό, υδρόφοβο τμήμα τους που εξέρχεται από το ριβόσωμα (Guna and Hegde, 2018). Τα μονοπάτια Sec και Tat, αποτελούν δύο συντηρημένους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τη μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Natale et al., 2008). Μέσω του μονοπατιού SecA/SecB εξάγονται πρωτεΐνες που δεν έχουν αναδιπλωθεί πλήρως και συνεχίζουν την διαδικασία αναδίπλωσης στο περίπλασμα ή εισέρχονται στην εξωτερική μεμβράνη (Smets et al., 2019), ενώ το μονοπάτι Tat επεξεργάζεται συνήθως πρωτεΐνες που είτε αναδιπλώνονται γρήγορα στο κυτταρόπλασμα είτε προσδένουν συμπαράγοντες και τις εξάγει πλήρως αναδιπλωμένες (Kudva et al., 2013). Για την ένθεση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά gram βακτηρίων χρησιμοποιείται το μονοπάτι SRP (Luirink et al., 2005).

Καθώς οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που παράγονται στο κυτταρόπλασμα είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε λάθος αναδίπλωση και συσσωμάτωση, λόγω του υδρόφιλου περιβάλλοντος, η διαδικασία της εισαγωγής τους στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη διαδικασία της μετάφρασης, με ένα μηχανισμό συν-μεταφραστικής στόχευσης. Συγκεκριμένα, η στόχευση στη μεμβράνη του βακτηρίου πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από το SRP. Το SRP του *E. coli* είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από την πρωτεΐνη Ffh και ένα 4.5S RNA, το οποίο προσδένεται στα ριβοσώματα κοντά στη σήραγγα εξόδου των πεπτιδίων και στην περίπτωση που σε αυτό συντίθεται μια

πρωτεΐνη που πρέπει να μεταφερθεί στη μεμβράνη, σηματοδοτεί τη διαδικασία της μεμβρανικής στόχευσης, ενώ σε κάθε διαφορετική περίπτωση αποδεσμεύεται από το ριβόσωμα.

Το πρώτο βήμα, λοιπόν, της βιοσύνθεσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι η αναγνώρισή τους. Αρχικά βιοσυντίθεται ένα μικρό τμήμα της πρωτεΐνης στο ριβόσωμα το οποίο εμπεριέχει μια υδρόφοβη αλληλουχία-σήμα με υψηλή τάση να σχηματίσει μια  $\alpha$ -έλικα (Robinson et al., 2012). Το SRP που είναι συνδεδεμένο με το ριβόσωμα αλληλεπιδρά με την αλληλουχία-σήμα και την προστατεύει από το κυτταροπλασματικό περιβάλλον, συμβάλλοντας έτσι στην αποφυγή της συσσωμάτωσης ή της λανθασμένης αναδίπλωσης του υδρόφοβου τμήματός της πρωτεΐνης (Mercier et al., 2022).

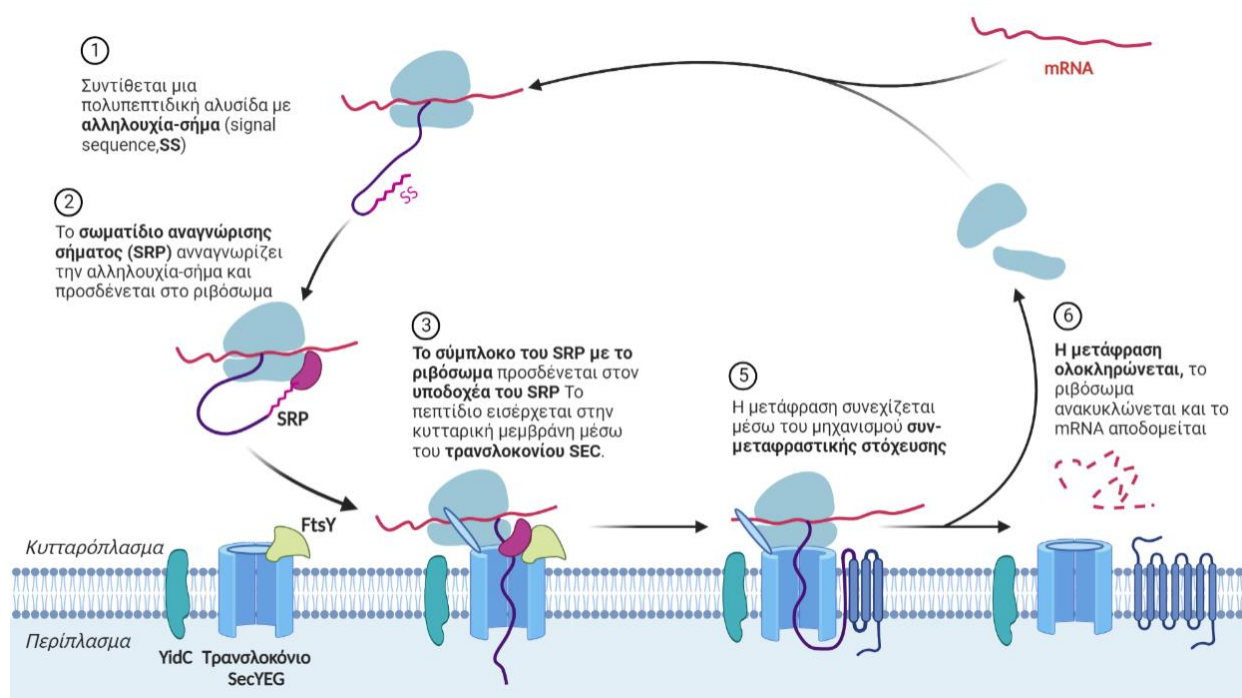
Το δεύτερο βήμα είναι η στόχευση του ισχυρού συμπλόκου του ριβοσώματος με το SRP και τη νέο-συντιθέμενη πρωτεΐνη, στο κυτταροπλασματικό άκρο της μεμβράνης του κυττάρου, μέσω της αλληλεπίδρασης του SRP με τον υποδοχέα του, την πρωτεΐνη FtsY. Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται συνδεδεμένος στο τρανσλοκόνιο SecYEG (SecYEG translocon), το οποίο είναι ενσωματωμένο στην εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου. Ο υποδοχέας FtsY διαθέτει μια εγγενώς αποδιαταγμένη περιοχή στο N-τελικό άκρο του που αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και με το τρανσλοκόνιο SecYEG, και μια περιοχή ομόλογη με την πρωτεΐνη Ffh του SRP που επιτρέπει την ένωση των δύο πρωτεϊνών (Lakomek et al., 2016). Οι λεπτομέρειες του μηχανισμού της ένωσης αυτής δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά φαίνεται πως απαιτείται η ύπαρξη συνδεδεμένου GTP τόσο στο SRP όσο και στο FtsY, ενώ πραγματοποιείται υδρόλυση αυτού μετά το σχηματισμό του δεσμού (Zhang et al., 2010; Mercier et al., 2022). Με την ένωση του συμπλόκου στο εσωτερικό της μεμβράνης, τροποποιείται η στερεοδιάταξή του, το SRP αποδεσμεύεται και το ριβόσωμα απελευθερώνεται προκειμένου να συνεχιστεί η μετάφραση. Έτσι η διαδικασία της μετάφρασης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε ριβοσώματα που βρίσκονται ενωμένα στο κυτταροπλασματικό άκρο της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την ένθεση των

νεοσύστατων πρωτεϊνών απευθείας στο εσωτερικό της μεμβράνης μέσω του τρανσλοκονίου SecYEG.

Το τρίτο βήμα της ένθεσης των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηρίων πραγματοποιείται από το τρανσλοκόνιο SecYEG. Πρόκειται για ένα τριμερές σύμπλοκο αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες SecY, SecE και SecG (Denks et al., 2014). Το μεγαλύτερο από τα συστατικά του, η πρωτεΐνη SecY απαρτίζεται από δέκα διαμεμβρανικές α-έλικες που σχηματίζουν ένα κανάλι που διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη (Van den Berg et al., 2004). Η στερεοδιάταξη του SecYEG μπορεί να τροποποιηθεί με δύο τρόπους ανάλογα με τη το αν η πρωτεΐνη που συντίθεται από το ριβόσωμα που έχει προσκολληθεί σε αυτό πρέπει να περάσει μέσα από τη μεμβράνη στο περίπλασμα (στην περίπτωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο μονοπάτι Sec) ή πρέπει να ενσωματωθεί σε αυτή (στην περίπτωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο μονοπάτι SRP), οπότε ανοίγει πλευρική πύλη μέσα από τον πόρο για απευθείας ένθεση στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Ge et al., 2014; Park et al., 2014). Οι διαμεμβρανικές έλικες των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορούν να υιοθετήσουν δύο βασικές τοπολογίες κατά την είσοδό τους στη μεμβράνη: το N-τελικό άκρο τους να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και το C-τελικό στο περίπλασμα (N-in topology) ή το αντίθετο (N-out topology). Ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την τοπολογία τους είναι η θέση των θετικά φορτισμένων αμινοξέων εντός της διαμεμβρανικής έλικας, καθώς οι περιοχές που έχουν θετικό φορτίο προσανατολίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης (positive inside rule) (von Heijne, 1992). Η αποτελεσματικότητα του κανόνα αυτού επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ισχύς του θετικού φορτίου, η υδροφοβικότητα της διαμεμβρανικής περιοχής, το δυναμικό της μεμβράνης και η λιπιδική της σύνθεση (Kuhn et al., 2017) (**Εικόνα 8**).

Στη βιοσύνθεση και τη μεμβρανική στόχευση πρωτεϊνών μπορούν να συμμετέχουν επιπλέον μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) που βοηθούν στην προστασία και την αναδίπλωση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη YidC, η οποία βρίσκεται ενσωματωμένη

στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και η λειτουργία της μπορεί να διευκολύνει τη συν-μεταφραστική αναδίπλωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών στο τρανσλοκόνιο. Πρόκειται για μια απαραίτητη για την επιβίωση πρωτεΐνη στα βακτήρια (Gerdes et al., 2003), ομόλογα της οποίας εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια (Oxa1) (McDowell et al., 2021), τους χλωροπλάστες (Alb3) (Sundberg et al., 1997), στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων (GET1, EMC3 και TMC01) (Anghel et al., 2017) και στα αρχαία (Ylp1 ή DUC160) (Borowska et al., 2015). Η δομή της περιλαμβάνει έξι διαμεμβρανικές έλικες και θεωρείται ότι η λειτουργία της προάγει την είσοδο των διαμεμβρανικών τμημάτων στη μεμβράνη διευκολύνοντας τη μετατόπιση φορτισμένων βρόγχων που συνδέονται στο υδρόφιλο αυλάκι του SecYEG. Στο κύτταρο, η YidC μπορεί να λειτουργεί είτε σε συνεργασία με το τρανσλοκόνιο SecYEG (Scotti et al., 2000) είτε σε κάποιες περιπτώσεις μόνη της (Serek et al., 2004).



**Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της συν-μεταφραστικής στόχευσης μεμβρανικών πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη βακτηρίων.** Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ενσωματώνονται στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηρίων κυρίως με το μονοπάτι SRP. Αρχικά, η το πρώτο τμήμα της αλληλουχίας που εξέρχεται από το ριβόσωμα διαθέτει μια αλληλουχία αναγνώρισης σήματος την οποία αναγνωρίζει το SRP και προσδένεται. Το

σύμπλοκο ριβοσώματος-πρωτεΐνης-SRP στοχεύεται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω της πρόσδεσης του υποδοχέα του SRP, της πρωτεΐνης FtsY, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο τρανσλοκόνιο SecYEG. Η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη μεταφέρεται στο τρανσλοκόνιο SecYEG. Το SRP αποδεσμεύεται από το ριβόσωμα και επιτρέπει την συνέχιση της μεταγραφής, η οποία πραγματοποιείται με ταυτόχρονη ένθεση των διαμεμβρανικών τμημάτων στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Η μετάφραση ολοκληρώνεται, το ριβόσωμα αποδεσμεύεται από την μεμβράνη και ανακυκλώνεται και το mRNA που κωδικοποιούσε τη συγκεκριμένη μεμβρανική πρωτεΐνη αποδομείται. Η πρωτεΐνη YidC βοηθάει την ένθεση της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη και είναι δυνατόν να λειτουργεί και αυτόνομα από το τρανσλοκόνιο SecYEG. (Η εικόνα δημιουργήθηκε στον ιστότοπο biorender.com)

## **1.8. Εμφάνιση τοξικότητας κατά την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο**

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί έναν από τους πιο επιτυχημένους οργανισμούς-ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, όμως, η υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε αυτό, αποτελεί, όπως αναφέρθηκε, μια ιδιαίτερα δύσκολη διεργασία της οποίας η αποτελεσματικότητα μπορεί να είναι αρκετά χαμηλή. Κατά τη βακτηριακή υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών εμφανίζονται συχνά φαινόμενα έντονης κυτταροτοξικότητας, που μειώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Τα φαινόμενα αυτά είναι ιδιαίτερα εμφανή κατά την ετερόλογη έκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ευκαρυωτικής προέλευσης (Andrell and Tate, 2013). Η τοξικότητα που εμφανίζεται, μπορεί να οδηγήσει τελικά σε πολύ χαμηλά επίπεδα βιομάζας ή ακόμη και σε πλήρη παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της καλλιέργειας, άρα κατ' επέκταση σε μειωμένη αποδοτικότητα ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας (Wagner et al., 2007; Gubellini et al., 2011).

Στην προσπάθεια ερμηνείας του φαινομένου της κυτταροτοξικότητας κατά την υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών, έχουν σχηματιστεί διάφορες υποθέσεις, χωρίς ωστόσο να έχει

επιβεβαιωθεί πλήρως κάποια από αυτές. Αρχικά, η εμφάνιση της εν λόγω τοξικότητας θα μπορούσε να επέρχεται ως αποτέλεσμα υπερφόρτωσης του τρανσλοκονίου SecYEG, το οποίο όπως αναφέρθηκε είναι το βασικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που χρησιμοποιείται από το βακτήριο για την ένθεση των νέο-συντιθέμενων πρωτεϊνών στη μεμβράνη αλλά και για τη μεταφορά των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο περίπλασμα. Ο κορεσμός αυτός του τρανσλοκονίου ενδεχομένως συνδέεται επίσης με φαινόμενα όπως η δυσλειτουργία του μηχανισμού κυτταρικής αναπνοής, η ενεργειακή ανεπάρκεια λόγω μειωμένου ενεργειακού μεταβολισμού, η μείωση της κυτταρικής διαίρεσης και η διαταραχή της ομαλής λειτουργίας του κυτταρικού φακέλου. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι σε καταστάσεις υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών επηρεάζεται το σύνολο των πρωτεϊνών του κυττάρου. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση συγκεκριμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης ανταγωνίζεται τις ενδογενείς, οδηγεί στη συσσώρευση και τη συσσωμάτωση στο κυτταρόπλασμα πρόδρομων μορίων εκκρινόμενων πρωτεϊνών που δε κατάφεραν να διαπεράσουν την εσωτερική μεμβράνη λόγω της υπερφόρτωσης του τρανσλοκονίου, καθώς και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών εξαιτίας της συνολικής διαταραχής της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (Wagner et al., 2006; Wagner et al., 2007). Είναι επίσης πιθανό οι βιοχημικές και βιοφυσικές ιδιότητες της ίδιας της μεμβρανοπρωτεΐνης που παράγεται να δημιουργούν την εν λόγω τοξικότητα ή ακόμη ο μηχανισμός βιοσύνθεσης πρωτεϊνών να καταρρέει εξαιτίας του αυξημένου μεταγραφικού ρυθμού των ανασυνδυασμένων γονιδίων, το οποίο ίσως αποτρέπει τη σύνθεση απαραίτητων ενδογενών πρωτεϊνών (Wagner et al., 2008; Gubellini et al., 2011).

## **1.9. Η αποδόμηση των μορίων mRNA στα βακτήρια**

Η ικανότητα των βακτηρίων να ρυθμίζει με ακρίβεια την έκφραση της γενετικής πληροφορίας ώστε να παράγονται οι απαραίτητες κάθε φορά πρωτεΐνες και η διατήρηση της ισορροπίας από

πλευράς λειτουργικότητας αλλά και διαθεσιμότητας των δομικών στοιχείων κάθε μορίου, που θα μπορεί επίσης να τροποποιείται ανάλογα με τις ενδοκυτταρικές και περιβαλλοντικές απαιτήσεις αποτελεί το κλειδί της επιβιώσής τους. Στο *E. coli* η πρωτεϊνική σύνθεση μπορεί να ελεγχθεί σε οποιοδήποτε από τα τρία στάδια της μεταγραφής, της μετάφρασης αλλά και της αποδόμησης των μορίων mRNA και της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η εξέλιξη της ικανότητας των βακτηρίων να αποδομούν μόρια mRNA ήταν επιτακτική, καθώς το ενεργειακό κόστος της μετάφρασης και το όφελος από την ανακύκλωση ριβονουκλεοτιδίων μπορούν να ισορροπήσουν μόνο σε συνθήκες στις οποίες η καταστροφή των μεταγραφημάτων που δεν είναι πλέον χρήσιμα, μπορεί να πραγματοποιηθεί με εξαιρετικά μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια. Επιπλέον, η ταχεία αποδόμηση του mRNA προσδίδει στο *E. coli* τη δυνατότητα να επαναχρησιμοποιήσει τα ριβονουκλεοτίδια και να προσαρμόσει το μηχανισμό πρωτεϊνικής σύνθεσης, ανταποκρινόμενο σε περιβαλλοντικές αλλαγές, διαδικασία που θα ήταν σημαντικά πιο αργή εάν υπήρχε πλήρης εξάρτηση από τη ρύθμιση της μεταγραφής (Hui et al., 2014).

Τα βακτήρια πραγματοποιούν την αποδόμηση των μεταγραφημάτων τους χρησιμοποιώντας ένα σύνολο τουλάχιστον 21 διαφορετικών ριβονουκλεολυτικών ενζύμων που ονομάζονται ριβονουκλεάσες (RNάσες), οι οποίες χωρίζονται ανάλογα με την λειτουργία του σε τρεις κατηγορίες: τις ενδοριβονουκλεάσες, τις εξωριβονουκλεάσες και τις ολιγοριβονουκλεάσες (Mackie, 2013).

Οι ενδονουκλεάσες είναι αυτές που ξεκινούν συνήθως τη διαδικασία της αποδόμησης καθώς κόβουν τμήματα mRNA στο εσωτερικό του μορίου, μακριά από το 5' άκρο. Η πιο γνωστή βακτηριακή ενδονουκλεάση είναι RNάση E (Khemicic et al., 2008), της οποίας η δράση επηρεάζει το μεγαλύτερο μέρος του μεταγραφώματος και η RNάση G της οποίας η αμινοξική ακολουθία μοιάζει αρκετά με το καταλυτικό τμήμα της RNάσης E και δρα συμπληρωματικά με αυτή (Lee et al., 2002). Επιπλέον σε κάποιους οργανισμούς που απουσιάζει η RNάση E, όπως για παράδειγμα στο βακτήριο *Bacillus subtilis*, εντοπίζεται η RNάση Y που δρα παρόμοια με

την RNάση E (Lehnik-Habrink et al., 2011), και η RNάση III που κόβει δίκλωνα τμήματα mRNA (Blaszczyk et al., 2004). Επιπλέον, στα γονιδιώματα των βακτηρίων κωδικοποιούνται μερικές ακόμη μικρότερης σημασίας ενδονουκλεάσες, όπως η RNάση P που συμμετέχει στην ωρίμανση του 5' άκρου σε μόρια tRNA (Li and Altman, 2003) και η RNάση Z που αφαιρεί εσφαλμένα 3' άκρα από μόρια tRNA στο *E. coli* (Dutta and Deutscher, 2009).

Η δραστηριότητα των βακτηριακών ενδονουκλεασών συμπληρώνεται με τη δράση των εξωνουκλεασών προκειμένου να πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ταχύτητα η αποδόμηση των ενδιάμεσων μορίων που σχηματίζονται, και έχουν χάσει την προστασία τους σε ένα από τα δύο άκρα τους. Κατά κύριο λόγο, οι εξωνουκλεάσες ξεκινούν από ένα απροστάτευτο άκρο και δρουν προοδευτικά χωρίς μεγάλη εξειδίκευση. Στα βακτήρια εντοπίζονται 3' εξωνουκλεάσες που δρουν είτε υδρολυτικά σε μια μη αναστρέψιμη αντίδραση παραγωγής μονοφωσφορικών προϊόντων (π.χ. μέλη της οικογένειας RNR) (Zuo and Deutscher, 2001) είτε φωσφορολυτικά για την παραγωγή διφωσφορικών νουκλεοτιδίων σε μια αντιστρέψιμη αντίδραση (π.χ. ένζυμα της οικογένειας PDX) (Zuo and Deutscher, 2001). Επιπλέον, σε βακτήρια όπως το *Bacillus subtilis*, και όχι στο *E. coli*, εντοπίζεται μια 5' εξωνουκλεάση, η RNάση J (Mathy et al., 2007).

Τέλος, η διαδικασία της αποδόμησης μορίων mRNA ολοκληρώνεται από τις ολιγοριβονουκλεάσες οι οποίες διαθέτουν επίσης μια 3' εξωριβονουκλεολυτική δράση, μόνο που επιδεικνύουν ταυτόχρονα μια σημαντική προτίμηση σε μόρια RNA που δεν απαρτίζονται από περισσότερα από πέντε νουκλεοτίδια (Niyogi and Datta, 1975) και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στα βακτήρια καθώς διασπούν εντελώς τα ολιγομερή που απομένουν μετά τη δράση των υπόλοιπων εξωριβονουκλεασών.

Στο εσωτερικό των βακτηρίων εκτός από τη δράση μεμονωμένων ενζύμων, σε πολλές περιπτώσεις δημιουργείται ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το αποικοδομώσωμα (RNA degradosome), του οποίου η σύνθεση πιθανώς ενισχύει την αποτελεσματικότητα της

διαδικασίας της αποικοδόμησης μορίων RNA. Το πρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο έχει μελετηθεί κατά κύριο λόγο στο *E. coli*, όπου δημιουργείται με την RNάση E ως βάση πάνω στην οποία προσδένονται επιπλέον η PNPάση, η RhlB και ένα γλυκολυτικό ένζυμο, η ενολάση (Vanzo et al., 1998). Σε βακτήρια όπως το *Bacillus subtilis* που δεν εκφράζουν την RNάση E, έχει βρεθεί ότι πιθανώς και πάλι να προσδένονται μεταξύ τους πρωτεΐνες όπως η RNase J, η PNPάση, και η ελικάση του RNA CshA (Lehnik-Habrink et al., 2010).

Παρά τους διαφορετικούς συνδυασμούς ριβονουκλεασών που εντοπίζονται σε κάθε βακτήριο, τα μονοπάτια αποδόμησης μορίων mRNA είναι πανομοιότυπα μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο μηχανισμοί που ξεκινούν τη διαδικασία. Στην πρώτη, η αποδόμηση ξεκινάει με προσβολή μιας ενδονουκλεάσης απευθείας σε ένα μόριο mRNA (άμεση πρόσβαση), ενώ στη δεύτερη η διαδικασία αρχίζει μετά από μετατροπή της τριφωσφορικής ομάδας του 5' άκρου σε μονοφωσφορική (πρόσβαση που εξαρτάται από το 5' άκρο).

Στον πρώτο μηχανισμό της άμεσης πρόσβασης η διαδικασία ξεκινά με ένα αρχικό κόψιμο της ακολουθίας του RNA από μια ενδονουκλεάση, η οποία για το *E. coli* είναι η RNάση E (Taraseviciene et al., 1991). Το παραχθέν 5' τμήμα του mRNA τις περισσότερες φορές μένει απροστάτευτο στο 3' άκρο του, οπότε και αποδομείται γρήγορα από μια 3' εξωνουκλεάση ενώ η διαδικασία συνεχίζεται με διαδοχικές κοπές στο 3' τμήμα που απομένει από την RNάση E. Σε περίπτωση που υπάρχουν εμπόδια όπως για παράδειγμα θερμοδυναμικά ισχυρά ζεύγη βάσεων που υβριδίζουν και παρεμποδίζουν τη δράση της εξωνουκλεάσης, επεμβαίνουν μόρια όπως η πολύ-A πολυμεράση ή η PNPάση τα οποία προσθέτουν μια σειρά από αδερίνες στο 3' άκρο των ενδιάμεσων μορίων που σχηματίζονται (Cao and Sarkar, 1992; Mohanty and Kushner, 2000). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη διείσδυση της PNPάσης, με τη βοήθεια της RhlB, η οποία λειτουργεί εξωνουκλεολυτικά και τελικά διασπά αυτές τις πιο ισχυρά δομημένες περιοχές. Στο

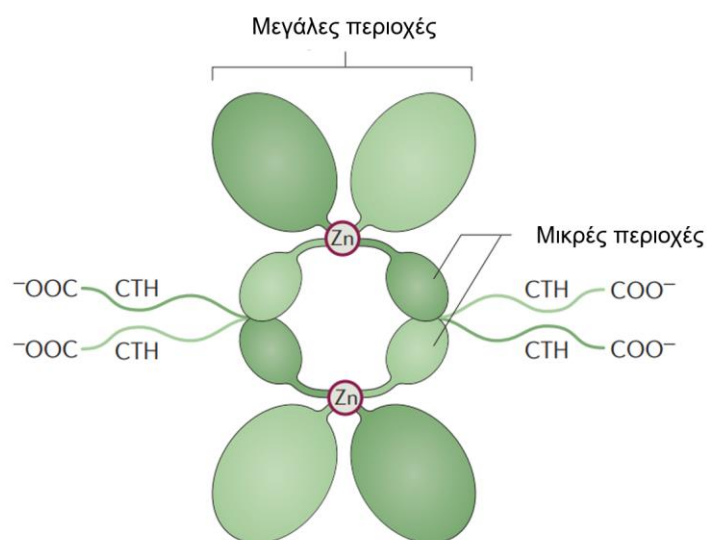
τέλος της δράσης των 3' εξωνουκλεασών απομένουν μόνο μικρά τμήματα του αρχικού RNA τα οποία αποδομούνται πλήρως από μια ολιγοριβονουκλεάση.

Στον δεύτερο μηχανισμό η διαδικασία της αποδόμησης μορίων mRNA ξεκινάει απευθείας από τη μετατροπή της τριφωσφορικής ομάδας του 5'-άκρου σε μονοφωσφορική μέσω της πρωτεΐνης RppH. Το mRNA μόριο που προκύπτει είναι πλήρους μήκους και αποδομείται γρήγορα είτε από την RNάση E, είτε από την RNάση J, ανάλογα με την ύπαρξη των σχετικών ενζύμων σε κάθε οργανισμό (Celesnik et al., 2007).

### **1.10. Η ενδονουκλεάση RNάση E του *E. coli***

Στο γονιδίωμα του *E. coli* κωδικοποιείται ένα σύνολο διαφορετικών ριβονουκλεασών από τις οποίες οι τρεις είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των κυττάρων: Η RNάση P, που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ενός ώριμου 5'-άκρου σε όλα τα μόρια tRNA και καταλύει την αποδόμηση συγκεκριμένων μορίων mRNA (Alifano et al., 1994), μια ολιγοριβονουκλεάση που αποδομεί τα εναπομείναντα ολιγομερή τμήματα των mRNA σε μονονουκλεοτίδια (Ghosh and Deutscher, 1999) και η RNάση E, η οποία ανακαλύφθηκε αρχικά ως ένα ένζυμο που είναι απαραίτητο για την επεξεργασία πρόδρομων μορίων rRNA και την ωρίμανση του 5S rRNA (Misra and Apirion, 1979). Μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι η RNάση E αποτελεί κατά κύριο λόγο το βασικό μόριο που καταλύει τη διάσπαση πλήθους μορίων mRNA στο εσωτερικό του βακτηρίου, ενώ ταυτόχρονα διαθέτει και μια δεύτερη σημαντική λειτουργία καθώς συμμετέχει στην επεξεργασία ενός εύρους πρόδρομων μορίων δομικού RNA, όπως ριβοσωματικό RNA, διάφορων μορίων tRNA, tmRNA και 6S RNA (Li and Deutscher, 2002; Carpousis et al., 2009). Το ενεργό ένζυμο της RNάσης E σχηματίζεται από την ένωση τεσσάρων μονομερών που δημιουργούν ένα ομοτετραμερές, το οποίο λειτουργεί είτε αυτόνομα, αποδομώντας μόρια mRNA, είτε αποτελεί τη βάση πάνω στην οποία δημιουργείται ένα

μακρομοριακό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το RNA αποικοδομώσωμα (RNA degradosome). Το κάθε μονομερές της RNάσης E, είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό μόριο μήκους 1061 αμινοξικών καταλοίπων, το οποίο χωρίζεται σε δύο διακριτές λειτουργικές περιοχές. Η πρώτη είναι η καλά συντηρημένη, καταλυτική, σφαιρική N-τελική περιοχή (N-terminal domain, NTD, αμινοξέα 1-529) η οποία προσδίδει την δραστικότητα της υδρόλυσης ριβονουκλεοτιδικών δεσμών στο ένζυμο, και σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της φαίνεται ότι μπορεί επιπλέον να χωριστεί σε τρεις υποπεριοχές: μια μεγάλη σφαιρική περιοχή (αμινοξέα 1-400), μια περιοχή πρόσθεσης ψευδαργύρου (Zn-link domain, αμινοξέα 401-414) και μια μικρή σφαιρική περιοχή (αμινοξέα 415-529), οι οποίες συμμετέχουν στη σταθεροποίηση του τετραμερούς που σχηματίζεται (**Εικόνα 9**) (Callaghan et al., 2005a).



**Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της δομής τους τετραμερούς της RNάσης E.** Η RNάση E σχηματίζεται στο εσωτερικό του βακτηρίου ως ένα διμερές από διμερή (Callaghan et al., 2005a). Κάθε μονομερές έχει χρωματιστεί με ανοιχτό ή σκούρο πράσινο. Το κάθε διμερές σταθεροποιείται αλληλεπίδραση μεταξύ των επιφανειών των μονομερών και μέσω της συσχέτισης με ένα μόριο ψευδαργύρου (Callaghan et al., 2005b). Η κατεύθυνση της CTD που σχεδιάστηκε είναι θεωρητική. (Προσαρμοσμένο σχήμα από (Mackie, 2013)).

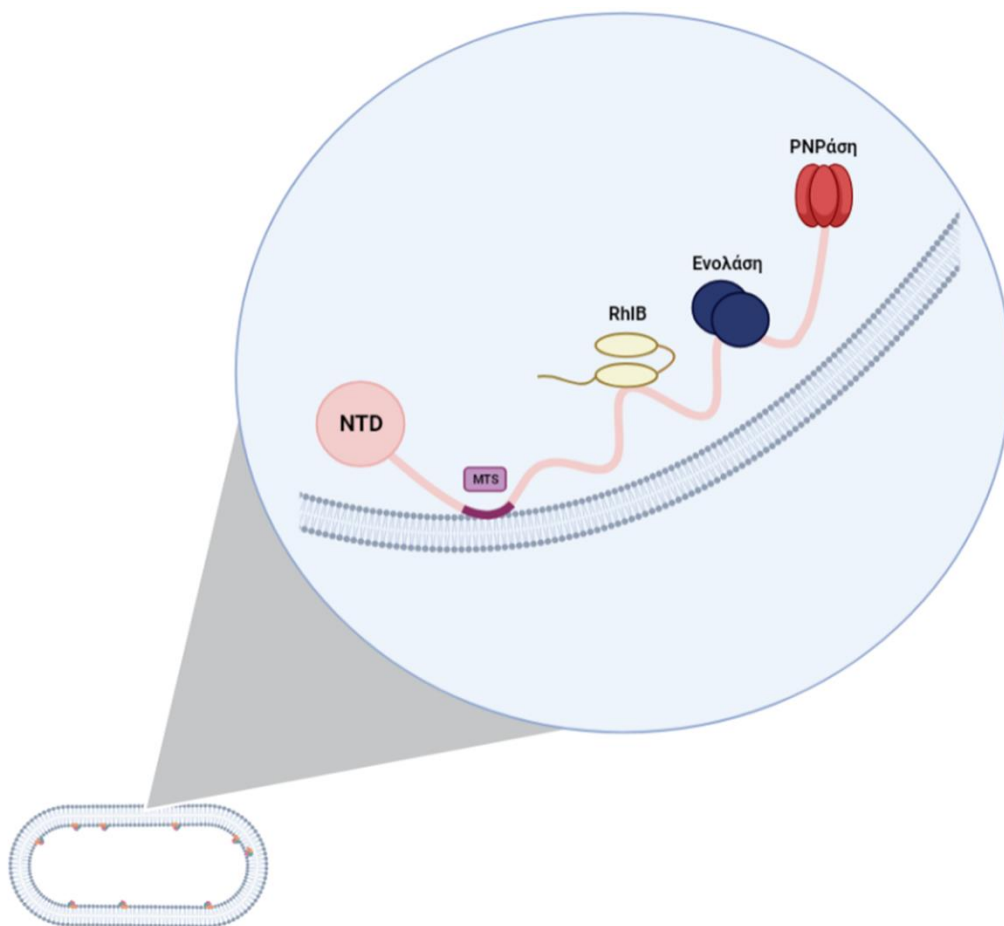
Η δεύτερη λειτουργική περιοχή της RNάσης E είναι η εγγενώς μη-διαταγμένη C-τελική περιοχή (C-terminal domain, CTD, αμινοξέα 530-1061) η οποία εμπεριέχει σημεία που πιθανώς

αποκτούν μια πιο σταθερή δευτεροταγή δομή και αποτελούν σημεία αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ενδονουκλεάση ή με την εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου (Callaghan et al., 2004). Το βασικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής με άλλες πρωτεΐνες, είναι ο σχηματισμός του RNA αποικοδομοσώματος, του μεγάλου πρωτεϊνικού συμπλόκου που χρησιμοποιείται από το κύτταρο προκειμένου να καταστεί ακόμη πιο αποτελεσματική η αποδόμηση μορίων mRNA. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης τριών πρωτεϊνών στην CTD: (i) της φωσφορολυτικής 3'-εξωριβονουκλεάσης PNPάση (polynucleotide phosphorylase, PNPase), η οποία είναι πιθανό να διευκολύνει την εξωνουκλεολυτική αποδόμηση των ενδιάμεσων μορίων που σχηματίζονται μετά την αρχική κοπή από την RNάση E, (ii) της RNA ελικάσης B (DEAD-box RNA helicase, RhlB), η οποία χρησιμοποιώντας το ATP, ξεδιπλώνει τις δευτεροταγείς δομές των RNA υποστρωμάτων ή αναδιαμορφώνει τα σύμπλοκα πρωτεϊνών με RNA προκειμένου να είναι προσβάσιμες οι θέσεις διάσπασης (Py et al., 1996), και (iii) της ενολάσης, ο ρόλος της οποίας δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, φαίνεται όμως ότι η αλληλεπίδρασή της με την RNάση E απαιτείται για τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης υπό αναερόβιες συνθήκες ενώ είναι πιθανό να διευκολύνει επίσης την αναγνώριση του μεταβολικού σταδίου στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο (Morita et al., 2004; Murashko and Lin-Chao, 2017).

Εκτός από τις θέσεις πρόσδεσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών που σχηματίζουν το αποικοδομοσώμα, στην C-τελική περιοχή της RNάσης E εντοπίζονται μερικές ακόμη περιοχές με συγκεκριμένη λειτουργία. Αρχικά κωδικοποιούνται δύο περιοχές πλούσιες σε αργινίνη, οι οποίες έχει αποδειχθεί *in vitro* πως δεσμεύουν μόρια RNA και θεωρείται πως ενισχύουν την αποδομητική δράση της ενδονουκλεάσης (Lopez et al., 1999). Επιπλέον, στην αρχή της μη καταλυτικής C-τελικής περιοχής εντοπίζεται μια ακολουθία στόχευσης στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου (αμινοξέα 565-582), η οποία φαίνεται ότι σχηματίζει μια αμφιπαθή α-έλικα που συμμετέχει στην πρόσδεση της RNάσης E και του αποικοδομοσώματος στο

εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, γεγονός που κατά πάσα πιθανότητα βοηθάει στην χωροταξική απομάκρυνση των υποκυτταρικών σημείων που λαμβάνει χώρα η μεταγραφή και η μετάφραση, παρά την απουσία πυρηνικής μεμβράνης στο βακτήριο (Khemicí et al., 2008).

Η δράση της RNάσης E εμπεριέχει την δημιουργία των πρώτων εγκοπών στο εσωτερικό μονόκλωνων μορίων mRNA που πρόκειται να αποδομηθούν, σε σημεία που είναι πλούσια σε αδερίνες και ουρακίλες, χωρίς ωστόσο να έχει μεγάλη εξειδίκευση. Επιπλέον, καθώς η RNάση E είναι ένα ευρείας εφαρμογής ένζυμο, τα επίπεδα λειτουργίας της πρέπει να ρυθμίζονται με μεγάλη ακρίβεια. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού στο βακτήριο υπάρχει ένας μηχανισμός αυτορύθμισης με ένα *in cis* τρόπο, καθώς το mRNA που κωδικοποιεί την RNάση E, διασπάται από την ίδια, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο σχετικά σταθερά τα επίπεδα έκφρασής της στο βακτήριο (Jain and Belasco, 1995). Η ριβονουκλεολυτική δράση της RNάσης E ελέγχεται επίσης στο *E. coli* από τη δράση επιπλέον πρωτεϊνών, όπως οι RraA και RraB (Regulator of Ribonuclease Activity A και B), οι οποίες αλληλεπιδρούν με την ενδονουκλεάση σε ξεχωριστές θέσεις και επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργικότητά της (Lee et al., 2003; Gao et al., 2006) **(Εικόνα 10)**.



**Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που ενώνονται στην RNάση E για το σχηματισμό του αποικοδομοσώματος.** Η RNάση E διαθέτει μια σφαιρική N-τελική περιοχή και μια εγγενώς μη-διαταγμένη C-τελική περιοχή που φέρει τις θέσεις πρόσδεσης των υπόλοιπων πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτή και σχηματίζουν το RNA αποικοδομόσωμα. Προσδένεται στη μεμβράνη με μια αλληλουχία στόχευσης της μεμβράνης (membrane targeting sequence, MTS), και επιπλέον συνδέεται με την RhlB, την ενολάση και την PNPάση. Το αποικοδομόσωμα σχηματίζεται τελικά από το τετραμερές της RNάσης E που απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 9**.

### 1.11. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Η διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο έχει αποδειχθεί αρκετά επίπονη καθώς συνοδεύεται συχνά από φαινόμενα όπως η χαμηλή παραγωγικότητα και η εμφάνιση έντονης κυτταροτοξικότητας (Wagner et al., 2006). Εξαιτίας, όμως, των σημαντικών πλεονεκτημάτων του *E. coli* ως οργανισμός-ξενιστής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, έχουν επιχειρηθεί διάφορες προσεγγίσεις ανά τα χρόνια, προκειμένου να βελτιωθεί η αποδοτικότητα της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης ξεπερνώντας τα προβλήματα που δημιουργούνται. Οι προσεγγίσεις αυτές εντοπίζονται τόσο στη γενετική τροποποίηση στελεχών *E. coli*, όσο και στην παραλλαγή των μεμβρανοπρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

Ως προς την κατασκευή γενετικά τροποποιημένων βακτηριακών στελεχών, έχουν ακολουθηθεί στρατηγικές, όπως για παράδειγμα η επιλογή BL21(DE3) στελεχών με βάση την ικανότητά τους να επιβιώνουν όταν υπερεκφράζουν τοξικές πρωτεΐνες το οποίο οδήγησε στην απομόνωση των στελεχών C41(DE3) και C43(DE3) (Miroux and Walker, 1996), ή η επιλογή βακτηρίων που φέρουν μεταλλαγές, ως προς την ικανότητά τους να εκφράζουν μεμβρανικές πρωτεΐνες, των οποίων η έκφραση κωδικοποιείται ταυτόχρονα από δύο διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς, γεγονός που επιτρέπει τον διπλό έλεγχο της επιτυχημένης παραγωγής τους (Massey-Gendel et al., 2009). Μια άλλη προσέγγιση είναι η συμπαραγωγή άλλων πρωτεϊνών του *E. coli*. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί για παράδειγμα ότι η συν-έκφραση του κυτταροπλασματικού συστήματος μοριακών συνοδών DnaJ και DnaK βελτίωσε τα ποσοστά έκφρασης του μεταφορέα μαγνησίου CofA στο κυτταρόπλασμα και την εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου (Chen et al., 2003), ενώ η συν-έκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης FtsH αύξησε σημαντικά την παραγωγικότητα τεσσάρων διαφορετικών GPCRs (Link et al., 2008). Η διαγραφή της φυσιολογικής λειτουργίας γονιδίων του *E. coli* αποτελεί μια ακόμη στρατηγική που έχει

ακολουθηθεί στο παρελθόν. Μέσω μεταλλαξιγένεσης με μεταθετά στοιχεία, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη DnaJ, η οποία λειτουργεί ως μοριακή συνοδός στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου, εμποδίζει την ένθεση του ανθρώπινου κεντρικού υποδοχέα των κανναβινοειδών (central cannabinoid receptor, CB1, GPCR) στη μεμβράνη (Skretas and Georgiou, 2009). Επιπλέον, η διαγραφή της πρωτεΐνης trigger factor, η οποία αποτελεί ένα από τα μόρια που προσδένονται στις νέο-συντιθέμενες πρωτεΐνες που στοχεύονται στη μεμβράνη, σε μια λειτουργία παρόμοια με αυτή του σωματιδίου αναγνώρισης σήματος (SRP), με την ταυτόχρονη υπερέκφραση της πρωτεΐνης YidC, οδήγησε σε αύξηση της παραγωγικότητας συγκεκριμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Nannenga and Baneyx, 2011b). Ακόμη, η εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια-κλειδιά την πρωτεϊνικής έκφρασης μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, όπως για παράδειγμα η μεταλλαγή στον σ 70 παράγοντα (γονίδιο *rpoD*) (Tomatis et al., 2019).

Στο πλαίσιο της τροποποίησης της μεμβρανικής πρωτεΐνης προκειμένου να διευκολυνθεί η παραγωγικότητά της, έχουν επίσης ακολουθηθεί διαφορετικές στρατηγικές που περιλαμβάνουν για παράδειγμα, την έκφραση αυτής ως ένωση είτε στο N-τελικό είτε στο C-τελικό άκρο με άλλες πρωτεΐνες που βοηθούν την παραγωγή και την σωστή αναδίπλωση αυτής. Για παράδειγμα η παραγωγή του υποδοχέα NTR ενωμένο με την πρωτεΐνη πρόσδεσης μαλτόζης (maltose binding protein) στο N-τελικό του άκρο, βελτίωσε την παραγωγικότητά του στο *E. coli* (Tucker and Grisshammer, 1996), ενώ η έκφραση της ανθρώπινης μεμβρανικής πρωτεΐνης hKDEL ως ένωση στο C-τελικό άκρο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescence protein, GFP) βελτίωσε σημαντικά την απόδοση της έκφρασής της στο βακτήριο *Lactococcus lactis* (Drew et al., 2005). Η τυχαία μεταλλαξιγένεση σε γονίδια που κωδικοποιούν για μεμβρανοπρωτεΐνες έχει επίσης εφαρμοστεί ως στρατηγική βελτίωσης της παραγωγικότητάς τους, και έχει οδηγήσει σε επιτυχημένα παραδείγματα όπως στην περίπτωση της απομόνωσης

του πλήρως λειτουργικού υποδοχέα της νευροτενσίνης NTR1 από τον οργανισμό *E. coli* (Sarkar et al., 2008).

Ακολούθως αναλύονται τα βακτηριακά στελέχη που έχουν κατασκευαστεί και χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών:

#### BL21(DE3)

Το βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3) (Studier and Moffatt, 1986) έχει αποτελέσει στην πλειοψηφία των περιπτώσεων την αφετηρία για την περαιτέρω μελέτη και κατασκευή γενετικά τροποποιημένων στελεχών τα οποία θα μπορούν να είναι αποτελεσματικά στην υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Τα BL21 (Jeong et al., 2015) κύτταρα είναι παράγωγα του B στελέχους και κατασκευάστηκαν για τη βελτιωμένη παραγωγή υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών καθώς επιδεικνύουν μειωμένη πρωτεολυτική ικανότητα μέσω απενεργοποίησης της λειτουργίας δύο πρωτεασών τους: της κυτταροπλασματικής πρωτεάσης Lon (Ratelade et al., 2009) και της OmpT, η οποία είναι μια ενδοπρωτεάση της εξωτερικής μεμβράνης (Grodberg and Dunn, 1988). Επιπλέον στα κύτταρα αυτά, χρησιμοποιείται το σύστημα DE3 (Studier and Moffatt, 1986), το οποίο στηρίζεται στη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου από την πιο γρήγορη RNA πολυμεράση του λ φάγου T7 (T7 RNA polymerase) (Iost et al., 1992) αντί της φυσιολογικής RNA πολυμεράσης του *E. coli*. Συγκεκριμένα, στο χρωμόσωμα του βακτηρίου έχει εισαχθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση, υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή *lacUV5*. Απουσία της λακτόζης, ή του μη υδρολυόμενου χημικού αναλόγου αυτής, του isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), η πρωτεΐνη LacI λειτουργεί ως καταστολέας και προσδένεται στον υποκινητή *lacUV5*, όμοια με τον τρόπο που προσδένεται στον φυσιολογικό *lac* υποκινητή, εμποδίζοντας την πρόσβαση σε αυτόν από την *E. coli* RNA πολυμεράση και τελικά την έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης. Με την προσθήκη του μορίου-επαγωγέα (IPTG), επάγεται η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση στο

χρωμόσωμα του βακτηρίου και εκείνη με τη σειρά της αναγνωρίζει τον πολύ εξειδικευμένο υποκινητή *T7lac* ο οποίος βρίσκεται σε κάποιο pET πλασμίδιο και ελέγχει την έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου. Ο συνδυασμός λοιπόν της ισχύος του *lacUV5* υποκινητή με την εκλεκτικότητα και την ταχύτητα της T7 RNA πολυμεράσης, αυξάνουν τα επίπεδα παραγωγής mRNA, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μετάφρασης, καθιστώντας τα BL21(DE3) κύτταρα ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

#### C41(DE3) & C43(DE3)

Τα πιο γνωστά βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και έχουν προκύψει με βάση το στέλεχος BL21(DE3), είναι τα C41(DE3) και C43(DE3) (Miroux and Walker, 1996). Το 1996 ο Walker και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν μια τεχνική εξελικτικής πίεσης και απομόνωσαν στελέχη BL21(DE3) που παρουσίαζαν βελτιωμένα επίπεδα έκφρασης τοξικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα επιχείρησαν να υπερεκφράσουν την τοξική μιτοχονδριακή μεμβρανική πρωτεΐνη OGCP (oxoglutarate malate carrier protein) σε κύτταρα BL21(DE3) υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή T7, και απομόνωσαν κύτταρα που έφεραν αυθόρμητες μεταλλαγές οι οποίες επέτρεπαν την ανάπτυξη της καλλιέργειας καταπολεμώντας την επαγόμενη τοξικότητα. Το απομονωμένο αυτό στέλεχος ονομάστηκε C41(DE3). Εφαρμόζοντας την ίδια τεχνική ξανά, αυτή τη φορά στο στέλεχος C41(DE3) που κατασκεύασαν, και έχοντας ως πρωτεΐνη-μοντέλο και πάλι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, τη b υπομονάδα της F-ΑΤΡάσης του *E. coli*, απομόνωσαν ένα επιπλέον μεταλλαγμένο στέλεχος, το οποίο ονόμασαν C43(DE3). Τα δύο αυτά στελέχη αποδείχθηκαν ικανά να ανθίστανται στην τοξικότητα που προκαλείται από την παραγωγή ενός εύρους υδατοδιαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών και χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή κυρίως μεμβρανοπρωτεϊνών. Ο εντοπισμός των μεταλλαγών που έφεραν τα στελέχη C41(DE3) και C43(DE3) και η αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης τους πραγματοποιήθηκε αρκετά χρόνια αργότερα από τον de Gier και τους συνεργάτες του, όπου επιβεβαιώθηκε η αρχική υπόθεση της παρουσίας

μεταλλαγών στον υποκινητή *lacUV5*, που τον καθιστούν λιγότερο αποδοτικό στην παραγωγή T7 RNA πολυμεράσης (Wagner et al., 2008). Έτσι, μειώνονται τα επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης-στόχου, αλλά αυξάνεται η παραγωγικότητα των μεμβρανοπρωτεϊνών λόγω μείωσης της πίεσης στον μηχανισμό πρωτεϊνικής έκφρασης του κυττάρου (Baumgarten et al., 2018). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η λειτουργικότητα του *lon* υποκινητή έχει αποκατασταθεί στα C43(DE3) κύτταρα, οδηγώντας στην παραγωγή της Lon πρωτεάσης, γεγονός που βοηθάει στην απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν λάθος αναδίπλωση ή είναι ημιτελείς, αποφορτίζοντας με αυτό τον τρόπο το μονοπάτι βιοσύνθεσης μεμβρανοπρωτεϊνών (Kwon et al., 2015).

#### Lemo21(DE3)

Σύμφωνα με τα δεδομένα από την κατασκευή των προηγούμενων στελεχών, φαίνεται πως σε αντίθεση με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, για τη βακτηριακή υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών ο στόχος δεν είναι η μεγιστοποίηση του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου της πρωτεΐνης-στόχου, καθώς δημιουργούνται σημαντικά προβλήματα τόσο στην ποιότητα της πρωτεΐνης που παράγεται, όσο και στην εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού, λόγω υπερφόρτωσης του μηχανισμού βιοσύνθεσης πρωτεϊνών (Wagner et al., 2007). Η αρχή λειτουργίας του στελέχους Lemo21(DE3) στηρίζεται στην ιδέα ότι για κάθε μεμβρανοπρωτεΐνη, υπάρχει ένα βέλτιστο επίπεδο mRNA, μέσω του οποίου μεγιστοποιείται η παραγωγή της. Συγκεκριμένα, το σύστημα του Lemo21(DE3) είναι παρόμοιο με αυτό του BL21(DE3), αλλά έχει επιπλέον προστεθεί ένα πλασμίδιο στο οποίο κωδικοποιείται η παραγωγή της T7 λυσοζύμης υπό τον έλεγχο του υποκινητή της L-ραμνόζης. Η T7 λυσοζύμη αποτελεί τον φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης και έτσι, είναι δυνατή η βελτιστοποίηση των συνθηκών έκφρασης της κάθε μεμβρανοπρωτεΐνης-στόχου μέσω της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων L-ραμνόζης, που παράγουν διαφορετικά επίπεδα T7 λυσοζύμης τα οποία τελικά ρυθμίζουν τα επίπεδα της T7 RNA πολυμεράσης στο κύτταρο (Wagner et al., 2008).

## C44(DE3) & C45(DE3)

Δύο επιπλέον στελέχη που κατασκευάστηκαν πιο πρόσφατα από τον Miroux και τους συνεργάτες του με βάση το αρχικό BL21(DE3) στέλεχος, είναι τα C44(DE3) και C45(DE3) (Angius et al., 2018). Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν έχοντας ως πρωτεΐνη-στόχο αρχικά μια εκδοχή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης με την ιδιότητα να αναδιπλώνεται σωστά ακόμη και όταν είναι ενωμένη με πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν σωστή αναδίπλωση (superfolder green fluorescent protein, sfGFP) (Pedelacq et al., 2006), και στη συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να παράγουν μια σειρά προκαρυωτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών και μια ανθρώπινη μονοτοπική μεμβρανοπρωτεΐνη. Μετά από αλληλούχηση όλου του γονιδιώματός τους βρέθηκε ότι φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση που δημιουργούν ένα *amber* κωδικόνιο τερματισμού μεταγραφής (TAG) στα C44(DE3) κύτταρα και ένα *ochre* κωδικόνιο τερματισμού μεταγραφής (TAA) στα C45(DE3). Η ύπαρξη των κωδικονίων λήξης μπορεί σε σπάνιες περιπτώσεις να παρακάμπτεται με φυσικό τρόπο από τα κύτταρα, οδηγώντας έτσι στην έκφραση μιας μικρής αλλά επαρκούς ποσότητας T7 RNA πολυμεράσης, που οδηγεί τελικά στην μεταγραφή μικρότερων ποσοτήτων mRNA μεμβρανικών πρωτεϊνών σε σχέση με τα αρχικά BL21(DE3) κύτταρα, που όμως έχουν καλύτερη αναδίπλωση και εισέρχονται πιο αποτελεσματικά στη μεμβράνη.

## Mutant56(DE3)

Το βακτηριακό στέλεχος Mutant56(DE3) αναπτύχθηκε με βάση και πάλι το BL21(DE3), χρησιμοποιώντας μια γενετική σάρωση σχεδιασμένη για την απομόνωση μεταλλαγμένων βακτηριακών στελεχών που θα διευκολύνουν την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, έχοντας ως πρωτεΐνη-στόχο την προκαρυωτική YidC ενωμένη με την GFP. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν έφεραν μια μεταλλαγή σε ένα αμινοξικό κατάλοιπο της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία αποδυναμώνει τη σύνδεση του ενζύμου με τον T7 υποκινητή

που ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου αντί να μειώνει τα επίπεδα της T7 RNA πολυμεράσης (Baumgarten et al., 2017).

#### Evo21(DE3)

Μια διαφορετική προσέγγιση που βασίζεται και πάλι στο σύστημα του BL21(DE3), είναι η περίπτωση του στελέχους Evo21(DE3). Η ανάπτυξη του μεταλλαγμένου στελέχους πραγματοποιήθηκε μετασχηματίζοντας BL21(DE3) κύτταρα με πλασμιδιακό φορέα που εξέφραζε τη μεμβρανοπρωτεΐνη-στόχο, την προκαρυωτική YidC ενωμένη με την GFP. Τα βακτήρια αυτά στρώθηκαν σε τριβλία με τρία επίπεδα άγαρ, ώστε η δημιουργία αποικιών στην επιφάνεια να πραγματοποιηθεί πριν την αργή διάχυση του μορίου-επαγωγέα και του αντιβιοτικού από τα χαμηλότερα στρώματα, διασφαλίζοντας την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών πριν την επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης σε αυτά. Η πειραματική διαδικασία οδήγησε στην απομόνωση ενός μεταλλαγμένου στελέχους στο οποίο εκφράζεται μια παραλλαγή της φυσικής βακτηριακής ενδονουκλεάσης RNάσης E, γεγονός που υποστηρίζεται από τη θεωρία ότι η σταθερότητα του RNA στο κύτταρο έχει κεντρικό ρόλο στην τοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για μεμβρανοπρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε η ένθεση μεταθετού στοιχείου στο χρωμόσωμα, σε τμήμα της C-τελικής περιοχής του γονιδίου *rne* που κωδικοποιεί την RNάση E, δημιουργώντας έτσι μια γενετική απαλοιφή της ενδονουκλεάσης, η οποία όταν εκφράζεται επιτρέπει τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Heyde and Norholm, 2021). Το στέλεχος αυτό ονομάστηκε Evo21(DE3) και βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών σε σχέση με το αρχικό BL21(DE3).

Μια εναλλακτική προσέγγιση στην τροποποίηση των BL21(DE3) στελεχών είναι η χρήση διαφορετικών υποκινητών αντί του ισχυρού *lacUV5* για τη ρύθμιση των επιπέδων παραγωγής της T7 RNA πολυμεράσης. Προκειμένου να μειωθεί η διαρρέουσα έκφραση (έκφραση χωρίς

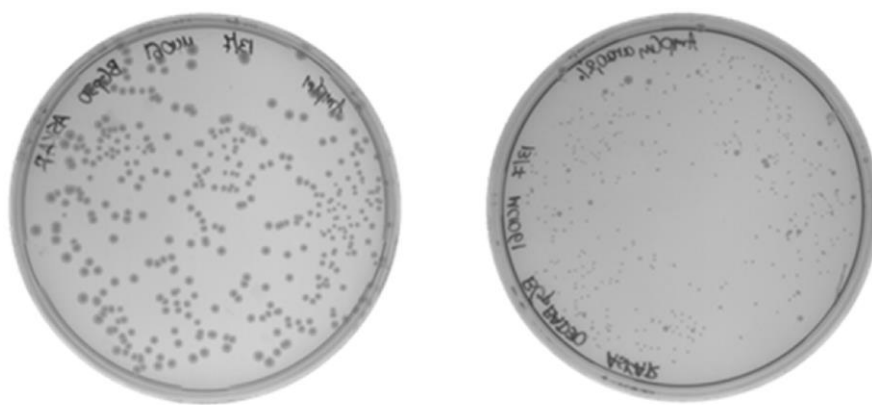
την προσθήκη μορίου-επαγωγέα) αλλά και να ρυθμιστούν καλύτερα τα επίπεδα μεταγραφής, έχουν δημιουργηθεί BL21(DE3) στελέχη, στα οποία ο *lacUV5* υποκινητής έχει αντικατασταθεί με άλλους υποκινητές των οποίων η έκφραση μπορεί να επαχθεί με την προσθήκη μορίων, όπως ο υποκινητής της αραβινόζης ( $P_{\text{araBAD}}$ ), ο υποκινητής της ραμνόζης ( $P_{\text{rhaBAD}}$ ) και ο υποκινητής της τετρακυκλίνης ( $P_{\text{tet}}$ ). Τα στελέχη αυτά στα οποία η επαγωγή της έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης πραγματοποιείται μέσω πιο «αδύναμων» υποκινητών, βρέθηκαν να είναι πιο αποτελεσματικά στην παραγωγή τριών βακτηριακών μεμβρανικών πρωτεϊνών (Du et al., 2021).

### 1.12. Τα βακτηριακά στελέχη SuptoxD και SuptoxR

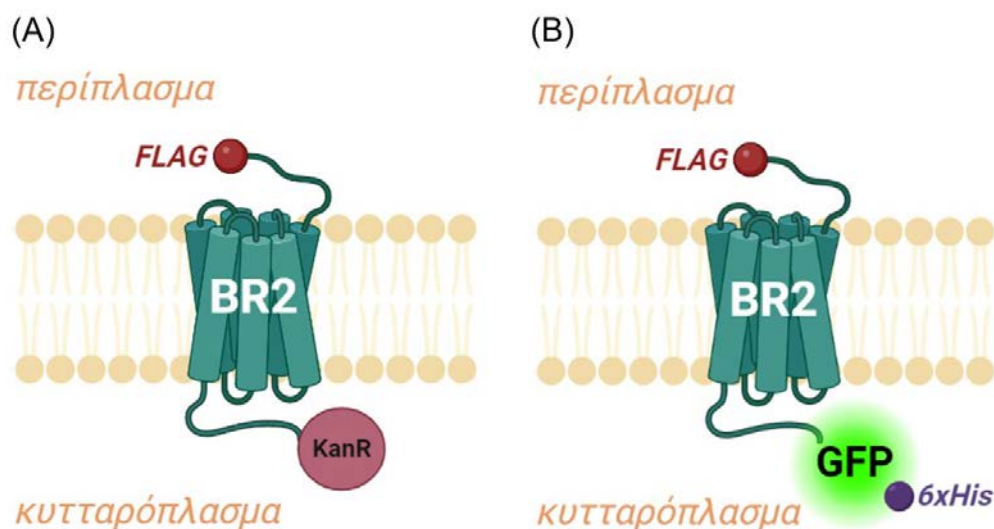
Στο πλαίσιο προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου όπου υλοποιήθηκε η συγκεκριμένη διδακτορική έρευνα, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών *E. coli* που θα ανθίστανται στην τοξικότητα που προκαλείται συχνά κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και θα παράγουν αυξημένα επίπεδα ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την επίτευξη του στόχου αυτού, ήταν η αναζήτηση, μέσα από μια διαδικασία γενετικής σάρωσης σε επίπεδο γονιδιώματος, γονιδίων του *E. coli* τα οποία όταν συν-εκφράζονται με γονίδια που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες θα μπορούν να καταστέλλουν αποτελεσματικά την τοξικότητα αυτή (Gialama et al., 2017b).

Στην προηγούμενη αυτή μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μεμβρανική πρωτεΐνη-μοντέλο ο ανθρώπινος υποδοχέας της βραδυκινίνης 2 (bradykinin receptor 2, BR2). Πρόκειται για ένα GPCR που αποτελεί φαρμακευτικό στόχο, καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση του καρδιαγγειακού συστήματος, στον πόνο και στη φλεγμονή (Shen and Zhang, 2023). Η δομή του προσδιορίστηκε πολύ πρόσφατα με τη χρήση κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Cryo-EM) (Shen et al., 2022). Η έκφρασή του στο βακτήριο *E. coli* έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξική παρά το γεγονός ότι τα ποσοστά παραγωγής του και εισαγωγής του στη μεμβράνη είναι ιδιαίτερα χαμηλά (Link et al., 2008) (**Εικόνα 11**). Στο πλαίσιο της πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν δύο

πλασμίδια που εξέφραζαν το γονίδιο *BDKRB2* που κωδικοποιεί για τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2. Το πρώτο ήταν το pBAD30BR2-KanR, το οποίο παράγει την μεμβρανοπρωτεΐνη ενωμένη στο N-τελικό της άκρο με ένα επίτοπο FLAG (FLAG tag) που διευκολύνει τον εντοπισμό της μέσω ανοσοαποτύπωσης, και στο C-τελικό της άκρο με την πρωτεΐνη aminoglycoside 3'-phosphotransferase (KanR), η οποία αποτελεί το ένζυμο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και χρησιμοποιήθηκε για τον εύκολο προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης μέσω της παρακολούθησης της ανάπτυξης της βακτηριακής καλλιέργειας παρουσία καναμυκίνης (Massey-Gendel et al., 2009). Το δεύτερο πλασμίδιο ήταν το pBAD30BR2-GFP το οποίο εκφράζει τη BR2 ενωμένη και πάλι με ένα επίτοπο FLAG στο N-τελικό της άκρο, και με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στο C-τελικό (Εικόνα 12). Η έκφραση της πρωτεΐνης και στους δύο πλασμιδιακούς φορείς τέθηκε υπό τον έλεγχο του υποκινητή *araBAD* (Guzman et al., 1995).



**Εικόνα 11: Εμφάνιση τοξικότητας κατά την επαγωγή της έκφρασης της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2.** Βακτηριακές αποικίες MC1061 *E. coli* κυττάρων που φέρουν το πλασμίδιο pBAD30BR2-GFP το οποίο κωδικοποιεί για τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2 και έχουν μεγαλώσει σε στερεό θρεπτικό μέσο LB χωρίς (αριστερά), και με (δεξιά) την προσθήκη του μορίου-επαγωγέα, L(+)-αραβινόζη σε συγκέντρωση 0,2 %, άρα χωρίς και με παραγωγή της μεμβρανοπρωτεΐνης, αντίστοιχα (προσαρμοσμένο σχήμα από (Gialama et al., 2017b)).



**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση της μεμβρανικής πρωτεΐνης bradykinin receptor 2 (BR2), όπως παράγεται από τους πλασμιδιακούς φορείς pBAD30BR2-KanR (A) και pBAD30BR2-GFP (B) αντίστοιχα. Η BR2 παράγεται και στις δύο περιπτώσεις ενωμένη στο N-τελικό της άκρο με τον επίτοπο FLAG ενώ στο C-τελικό της άκρο ενωμένη είτε με το ένζυμο KanR (A) είτε με την πρωτεΐνη GFP (B).

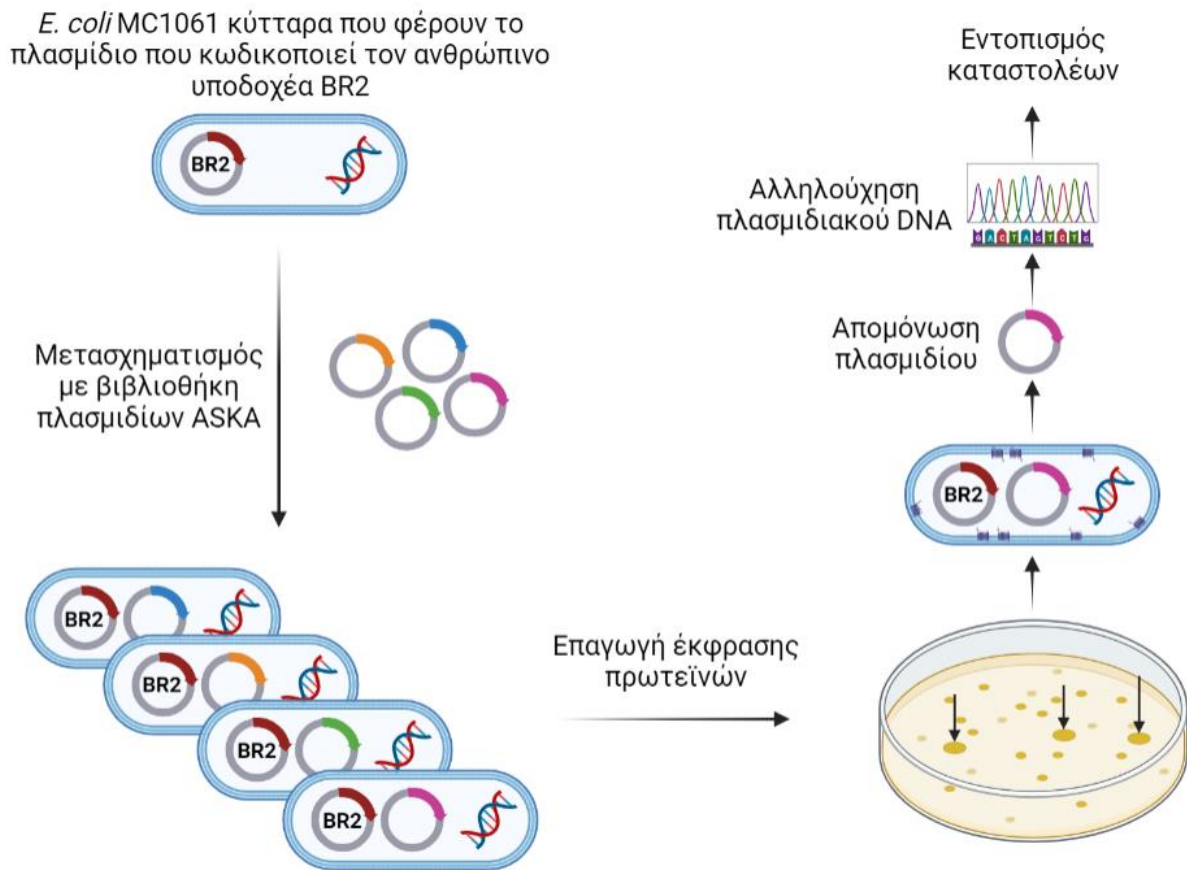
#### 1.12.1. Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών SuptoxD και SuptoxR

Η αναζήτηση γονιδίων του *E. coli* τα οποία θα λειτουργούν ως αποτελεσματικοί καταστολείς της κυτταροτοξικότητας που προκαλεί η υπερέκφραση της BR2 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την βιβλιοθήκη πλασμιδίων ASKA (A Complete Set of *Escherichia coli* K-12 ORF Archive) (Kitagawa et al., 2005). Στη βιβλιοθήκη αυτή, εμπεριέχονται περίπου 4000 διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς, κάθε ένας εκ των οποίων εκφράζει ένα διαφορετικό ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του *E. coli*, δηλαδή περίπου ένα διαφορετικό γονίδιο κάθε φορά, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *T5lac*.

Συγκεκριμένα, επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* MC1061 που έφεραν το πλασμίδιο pBAD30BR2-KanR, μετασχηματίστηκαν με τη βιβλιοθήκη ASKA. Από τη διαδικασία αυτή, προέκυψε ένας πληθυσμός κυττάρων, κάθε μέλος του οποίου διέθετε δύο πλασμίδια. Το ένα

κωδικοποιούσε για την ίδια μεμβρανική πρωτεΐνη (BR2) ενώ το άλλο για ένα διαφορετικό ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο του *E. coli*. Το σύνολο των βακτηρίων αφέθηκε να μεγαλώσει σε στερεό θρεπτικό μέσο LB το οποίο εμπεριείχε επιπλέον τα δύο αντιβιοτικά επιλογής (αμπικιλίνη και χλωραμφαινικόλη) που διασφάλιζαν τη διατήρηση των δύο πλασμιδίων στα κύτταρα, κατάλληλη συγκέντρωση αραβινόζης για την επαγωγή της έκφρασης της BR2, μια μικρή συγκέντρωση του αντιβιοτικού καναμυκίνη για την εξασφάλιση της παραγωγής πλήρους μήκους μεμβρανοπρωτεΐνης, και τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG, του μορίου-επαγωγέα της έκφρασης των γονιδίων της βιβλιοθήκης ASKA. Τα τριβλία επώαστηκαν στους 30°C για 48 ώρες, και σχηματίστηκαν τελικά μικρές και μεγάλες αποικίες. Επιλέχθηκαν οι μεγάλες αποικίες, ως ένδειξη της πιθανής καταστολής της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από την υπερέκφραση της BR2, και τελικά απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA που προήλθε από αυτές (**Εικόνα 13**).

Στη συνέχεια, από τους απομονωμένους κλώνους της βιβλιοθήκης ASKA που προήλθαν από τις μεγάλες αποικίες, επιλέχθηκαν αυτοί για τους οποίους επιβεβαιώθηκε πρώτον ότι η παρουσία τους είναι αυτή που προκαλεί αύξηση στην τελική συγκέντρωση βιομάζας και δεύτερον ότι η παρατηρούμενη καταστολή της τοξικότητας δε προκαλείται λόγω μείωσης των επιπέδων παραγωγής της BR2. Οι εναπομείναντες κλώνοι αλληλουχήθηκαν προκειμένου να αποκαλυφθούν τα γονίδια που εκφράζονται στα επιλαχόντα πλασμίδια της ASKA βιβλιοθήκης. Από την αλληλούχηση του πλασμιδιακού DNA προέκυψαν δύο τέτοιοι πιθανοί καταστολείς: (i) το γονίδιο *djlA*, που κωδικοποιεί τη μεμβρανική πρωτεΐνη DjIA της οποίας η λειτουργία είναι η ενεργοποίηση της μοριακής συνοδού DnaK του *E. coli* (DnaK co-chaperone) (Clarke et al., 1996) και (ii) το γονίδιο *rraA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RraA, η οποία λειτουργεί ως αναστολέας της δράσης της ενδονουκλεάσης του *E. coli*, της RNάσης E, να αποδομεί μόρια mRNA (Lee et al., 2003).

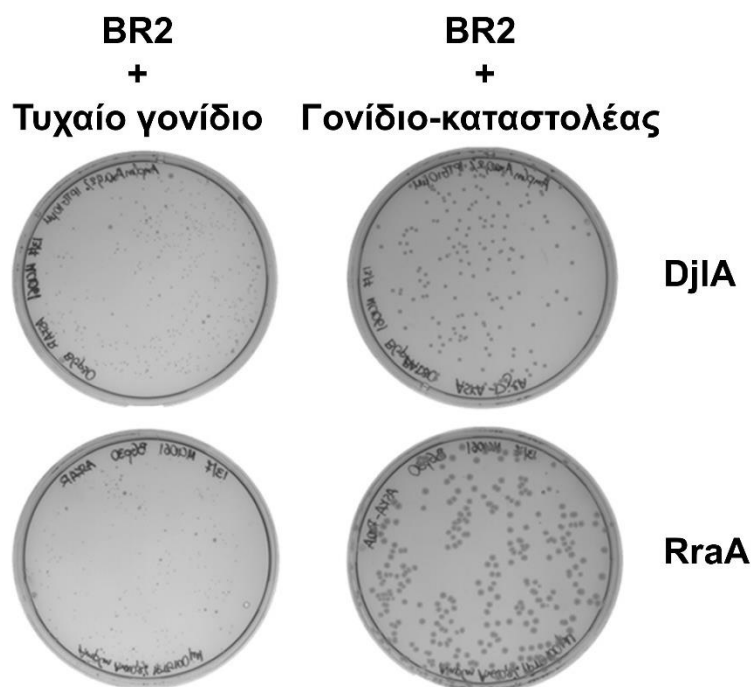


**Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας αναζήτησης πιθανών καταστολέων της επαγόμενης από τη BR2 κυτταροτοξικότητας στο γονιδίωμα του *E. coli*.** Επιδεκτικά κύτταρα MC1061 που έφεραν το πλασμίδιο pBAD30BR2-Kan το οποίο κωδικοποιεί τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2, μετασχηματίστηκαν με την πλασμιδιακή βιβλιοθήκη ASKA που κωδικοποιεί όλα τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια του *E. coli*. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τριβλία με στερεό θρεπτικό διάλυμα LB με την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικών και μορίων-επαγωγέων και σχηματίστηκαν μικρές και μεγάλες αποικίες. Οι μεγάλες αποικίες μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες, και τελικά απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε το πλασμιδιακό DNA τους αποκαλύπτοντας ποιο γονίδιο του *E. coli* κωδικοποιούσε το πλασμίδιο της βιβλιοθήκης που έφεραν οι αποικίες αυτές.

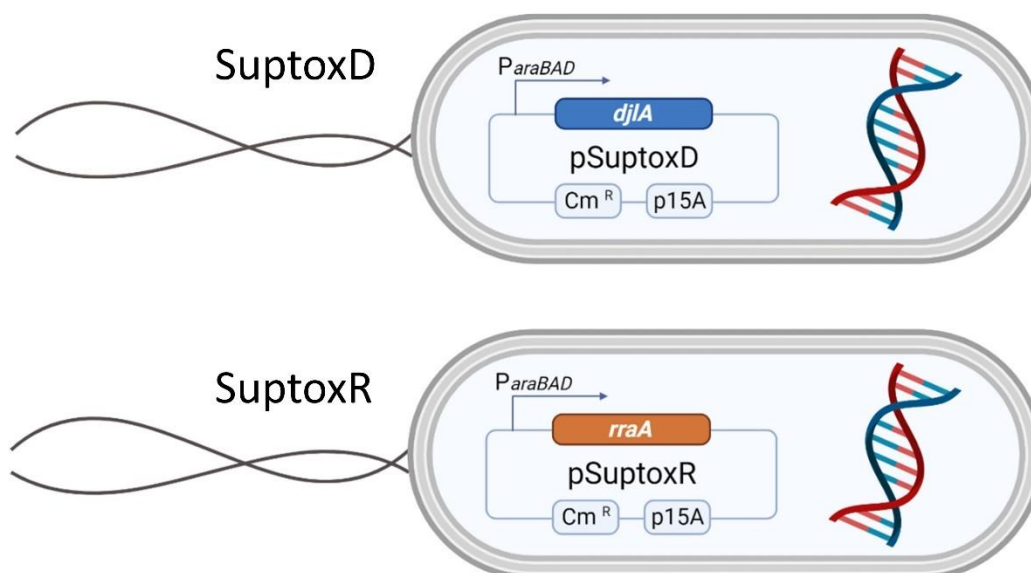
Η συνέκφραση των γονιδίων *djlA* και *rraA* σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* MC1061 που εκφράζουν την μεμβρανική πρωτεΐνη BR2 ως ένωση στο C-τελικό άκρο της με την GFP, κατέληξε στο σχηματισμό αισθητά μεγαλύτερων αποικιών σε σχέση με τα τριβλία στα οποία επάγεται η έκφραση της μεμβρανοπρωτεΐνης και ενός τυχαίου πλασμιδίου από τη βιβλιοθήκη

ASKA (**Εικόνα 14**), ενώ ταυτόχρονα η επαγωγή της έκφρασής τους αυξάνει την πυκνότητα υγρών καλλιιεργειών που υπερεκφράζουν την μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η θετική επίδραση της DjlA και της RraA, βρέθηκε ότι είναι ανεξάρτητη από το είδος του πλασμιδίου ή του υποκινητή που χρησιμοποιείται για την έκφραση όλων των πρωτεϊνών (DjlA, RraA και BR2). Κατά την υπερέκφραση μάλιστα της BR2-GFP από το πλασμίδιο pASK75 (Skerra, 1994) υπό τον έλεγχο του *tet* υποκινητή και την έκφραση των δύο συμπαραγόντων από το πλασμίδιο pBAD33 (πλασμίδιο με χαμηλό αριθμό αντιγράφων) υπό τον έλεγχο του υποκινητή *araBAD* (Guzman et al., 1995), παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα συσσώρευσης τελικής βιομάζας (**Error! Reference source not found.**). Επιπλέον, η παρατηρούμενη καταστολή της κυτταροτοξικότητας βρέθηκε ότι είναι ανεξάρτητη της παρουσίας των πρωτεϊνών GFP και KanR στο C-τελικό άκρο καθώς τα αποτελέσματα ήταν παρεμφερή, ή του στελέχους στο οποίο πραγματοποιείται η υπερέκφραση καθώς δοκιμάστηκε η υπερέκφραση από τα ίδια πλασμίδια και σε BL21(DE3) και σε BW25113 κύτταρα τα οποία είναι παράγωγα του B και του K-12 στελέχους του *E. coli*, αντίστοιχα (Gialama et al., 2017b).

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, κατασκευάστηκαν δύο νέα βακτηριακά στελέχη, τα SuptoxD (Suppressor of Toxicity: DjlA) και SuptoxR (Suppressor of Toxicity: RraA). Τα SuptoxD φέρουν το πλασμίδιο pSuptoxD το οποίο κωδικοποιεί το γονίδιο *djlA* ενώ τα SuptoxR φέρουν το πλασμίδιο pSuptoxR, που κωδικοποιεί το γονίδιο *rraA*. Και στις δύο περιπτώσεις η έκφραση του γονιδίου έχει τεθεί υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή και του μορίου-επαγωγέα του, της L(+)-αραβινόζης (**Εικόνα 15**) (Gialama et al., 2017b).



**Εικόνα 14: Καταστολή κυτταροτοξικότητας που επάγεται από την υπερέκφραση της BR2 κατά την υπερέκφραση των γονιδίων *djlA* ή *rraA*.** Σχηματισμένες βακτηριακές αποικίες σε στερεό θρεπτικό υλικό LB από κύτταρα MC1061 που έχουν μεγαλώσει για 3 μέρες στους 25 °C και εκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP ταυτόχρονα με ένα τυχαίο γονίδιο της βιβλιοθήκης ASKA (αριστερά) ή με μια από τις πρωτεΐνες DjlA (πάνω δεξιά) ή RraA (κάτω δεξιά) (προσαρμοσμένο σχήμα από (Gialama et al., 2017b)).



**Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των βακτηριακών στελεχών SuptoxD και SuptoxR.** Τα βακτηριακά στελέχη SuptoxD και SuptoxR καταστέλλουν αποτελεσματικά την τοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών στο *E. coli* στηριζόμενα στην υπερέκφραση των γονιδίων *djlA* και *rraA* αντίστοιχα, υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή και του μορίου-επαγωγέα του L(+)-αραβινόζη.

#### 1.12.2. Αποδοτικότητα των βακτηριακών στελεχών SuptoxD και SuptoxR ως προς τη συγκέντρωση ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών.

Στα στελέχη *E. coli* SuptoxD και SuptoxR που κατασκευάστηκαν, ελέγχθηκαν τα επίπεδα παραγωγής της ανασυνδυασμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. Για την εύκολη παρακολούθηση των επιπέδων στα οποία η BR2 παράγεται και ενσωματώνεται στη μεμβράνη χρησιμοποιήθηκε μια μεμβρανική χίμαιρα της BR2 με την GFP, καθώς είναι γνωστό ότι τα επίπεδα φθορισμού μιας καλλιέργειας *E. coli* κυττάρων που εκφράζει μια τέτοια πρωτεϊνική ένωση μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης με την GFP, είναι ανάλογα με τα επίπεδα στα οποία η μεμβρανοπρωτεΐνη παράγεται και εισέρχεται στη μεμβράνη (Drew et al., 2001; Drew et al., 2006). Επιχειρήθηκε, λοιπόν, αρχικά η υπερέκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2-GFP από

τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pASK75 σε βακτηριακά κύτταρα αγρίου τύπου, σε SuptoxD και σε SuptoxR. Στις καλλιέργειες που προέκυψαν μετρήθηκε ο φθορισμός ανά κύτταρο με χρήση κυτταρομετρίας ροής, ως ένδειξη της ποσότητας της πρωτεΐνης που παράγεται και εισέρχεται στη μεμβράνη, και βρέθηκε ότι στα κύτταρα που συνεκφράζονται οι πρωτεΐνες DjlA και RgaA παρατηρείται μεγαλύτερος φθορισμός μεμονωμένων κυττάρων σε σχέση με τα αγρίου τύπου βακτήρια (Gialama et al., 2017b).

Ο συνδυασμός της αποτελεσματικής καταστολής της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας που προκαλείται κατά την υπερέκφραση της BR2, που έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη ιδιαίτερα αυξημένων επιπέδων τελικής βιομάζας, και της ενισχυμένης παραγωγικότητας BR2 ανά κύτταρο, οδηγεί τελικά σε δραματικά αυξημένη αποδοτικότητα παραγωγής ανασυνδυασμένης μεμβρανοπρωτεΐνης ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας στα SuptoxD και SuptoxR στελέχη (Gialama et al., 2017b).

Τα στελέχη αυτά ελέγχθηκαν επιπλέον ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην παραγωγή μιας σειράς μεμβρανοπρωτεϊνών ευκαρυωτικής και προκαρυωτικής προέλευσης, των οποίων η παραγωγή επέφερε διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας στο *E. coli*. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν είχαν επίσης διαφορές σε χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, ο αριθμός των διαμεμβρανικών ελίκων ή η λειτουργία τους. Βρέθηκε ότι για κάθε μια από αυτές κάποιο από τα δύο στελέχη ή και τα δύο, βελτίωναν τα ποσοστά παραγωγής της εκάστοτε πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας το γεγονός ότι τα SuptoxD και SuptoxR είναι ευρείας εφαρμογής (Gialama et al., 2017b).

Τέλος η αποτελεσματικότητα των SuptoxD και SuptoxR συγκρίθηκε με τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη. Από το σύνολο των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών που έχουν δημιουργηθεί προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα πολύπλοκα προβλήματα της κυτταροτοξικότητας και της χαμηλής παραγωγικότητας που

εμφανίζονται συχνά κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, αυτά που χρησιμοποιούνται τις περισσότερες περιπτώσεις είναι τα C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3). Έτσι, καθώς στα Lemo21(DE3) κύτταρα υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση ραμνόζης που επιφέρει τα πιο υψηλά επίπεδα παραγωγής σε κάθε περίπτωση, αρχικά προσδιορίστηκε η ποσότητα αυτή για κάθε μια από τις διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράστηκε, και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε παραγωγή ενός εύρους μεμβρανοπρωτεϊνών συγκριτικά στα στελέχη SuptoxD, SuptoxR, C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3). Τα αποτελέσματα της συγκριτικής έκφρασης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι για κάθε μεμβρανοπρωτεΐνη που μελετήθηκε, τουλάχιστον ένα (ή και τα δύο) από τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR ξεπερνάνε σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη.

### 1.12.3. Η πρωτεΐνη DjlA

Η DjlA (DnaJ-like protein A) (Clarke et al., 1996) είναι μια από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιείται στο γονιδίωμα του *E. coli* και βρέθηκε ότι όταν συνεκφράζεται με γονίδια που κωδικοποιούν για μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορεί και καταστέλλει την τοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφρασή τους ενώ ταυτόχρονα επάγει την έκφραση ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών (Gialama et al., 2017b). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που βρίσκεται ενσωματωμένη στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, και διαθέτει τρεις διακριτές δομικές λειτουργικές περιοχές. Μια διαμεμβρανική N-τελική περιοχή, μέρος της οποίας εισέρχεται στο περίπλασμα, συμμετέχει στο διμερισμό της πρωτεΐνης και πιθανώς διευκολύνει τη σηματοδότηση που προκαλείται από τη DjlA (Kelley and Georgopoulos, 1997), μια κεντρική περιοχή άγνωστης λειτουργίας (Genevaux et al., 2001) και μια J-περιοχή (η οποία μοιάζει με την αντίστοιχη περιοχή της DnaJ) στο C-τελικού της άκρο, μεγάλο μέρος της οποίας βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και δημιουργεί την αλληλεπίδραση με την DnaK (Clarke et al., 1996). Η DjlA ανήκει σε μια κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζονται Hsp40 (heat-shock

proteins, 40 kDa) ή αλλιώς J-πρωτεΐνες, και λειτουργεί ως ενεργοποιητής της μοριακής συνοδού (co-chaperone) του *E. coli*, της DnaK, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των Hsp70 (heat-shock protein, 70 kDa).

Γενικά, οι πρωτεΐνες Hsp70 είναι μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones) που διαθέτουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης (proteostasis) του κυττάρου, ιδιαίτερα σε συνθήκες στρες, όπως για παράδειγμα σε αυξημένα επίπεδα θερμοκρασίας (Liu et al., 2020). Η εύρυθμη λειτουργία των Hsp70 προϋποθέτει τη συνεργασία με μια Hsp40 ή J-πρωτεΐνη, η οποία επιταχύνει το ρυθμό υδρόλυσης ATP της μοριακής συνοδού (Craig et al., 2006) ενώ ταυτόχρονα μπορεί και προσδένει απευθείας μη αναδιπλωμένες ή μερικώς αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, γεγονός που θεωρείται ότι προσφέρει άμεση πρόσβαση των Hsp70 στα υποστρώματα που πρόκειται να επεξεργαστούν (Kampinga et al., 2019). Η αλληλεπίδραση των J-πρωτεϊνών με τις Hsp70 πρωτεΐνες οφείλεται στη J-υπομονάδα, μια ακολουθία περίπου 70 αμινοξέων που διαθέτει επιπλέον ένα ισχυρά συντηρημένο τριπεπτίδιο, το His-Pro-Asp (HPD) σε έναν εκτεθειμένο βρόγχο της, και είναι απαραίτητο για τη λειτουργία τους να διεγείρουν την υδρόλυση του ATP (Genevaux et al., 2007). Στο *E. coli* εντοπίζονται τρεις μοριακοί συνοδοί Hsp70, οι DnaK, HscA και HscC και έξι J-πρωτεΐνες, οι DnaJ, CbpA, DjlA, HscB, DjlB και DjlC (Genevaux et al., 2007). Από το σύνολο των J-πρωτεϊνών, δεν συνεργάζονται όλες και με τις τρεις Hsp70, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών ζευγών που χρησιμοποιούνται από το κύτταρο για διαφορετικές λειτουργίες. Η DnaK έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά μόνο με την DnaJ, την CbpA και την DjlA (Genevaux et al., 2007), ενώ στην πλειοψηφία των περιπτώσεων συνεργάζεται με την πρώτη (Kityk et al., 2018).

Όπως αναφέρθηκε, κατά τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxD με γονίδια που κωδικοποιούν μεμβρανοπρωτεΐνες, αντιμετωπίζεται η επαγόμενη κυτταροτοξικότητα ενώ ταυτόχρονα αυξάνονται τα επίπεδα συσσώρευσης ανασυνδυασμένων

μεμβρανικών πρωτεϊνών. Αρχικά ελέγχθηκαν οι υπόλοιπες πέντε J-πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του *E. coli* ως προς την ικανότητά τους να βελτιώνουν την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και βρέθηκε ότι η DjlA είναι η μόνη ανάμεσα από αυτές που επιφέρει αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα (Gialama et al., 2017a). Στη συνέχεια, μέσα από μια σειρά πειραμάτων βρέθηκε αρχικά ότι η εμφάνιση των βελτιωτικών ιδιοτήτων του βακτηριακού στελέχους SuptoxD απαιτούν την έκφραση πλήρους μήκους DjlA η οποία έχει ενσωματωθεί στη μεμβράνη και η δράση της πραγματοποιείται μέσω της J υπομονάδας και απαιτείται λειτουργική αλληλεπίδρασή της με τη DnaK (Gialama et al., 2017a). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι δεν αρκεί η ύπαρξη μιας λειτουργικής J- υπομονάδας καθώς η DjlA βρέθηκε πως είναι η μόνη από τις J-πρωτεΐνες του *E. coli*, οι οποίες επίσης διέθεταν λειτουργικές J-περιοχές, που βοηθά τη διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών (Gialama et al., 2017a). Ένα ακόμα συμπέρασμα της μελέτης (Gialama et al., 2017a) ήταν ότι η θετική επίδραση της DjlA στην μεμβρανοπρωτεϊνική έκφραση δε πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού αντίδρασης σε στρες Rcs, καθώς τα αποτελέσματα ήταν πανομοιότυπα παρουσία και απουσία των παραγόντων RcsB και RcsC. Τέλος, το διαμεμβρανικό τμήμα της DjlA που βρίσκεται στη N-τελική περιοχή κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών (Gialama et al., 2017a). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός δράσης της DjlA είναι μάλλον άμεσος, και εμπεριέχει την απευθείας σύνδεση του συμπλόκου DjlA-DnaK με τη μεμβρανοπρωτεΐνη-στόχο, υποβοηθώντας τη σωστή αναδίπλωσή της ή και την ομαλή ένθεσή της στην εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου (Gialama et al., 2017a).

#### **1.12.4. Η πρωτεΐνη RraA**

Η δεύτερη πρωτεΐνη που εντοπίστηκε από την πειραματική διαδικασία της γενετικής σάρωσης σε επίπεδο γονιδιώματος, και λειτουργεί ως καταστολέας της κυτταροτοξικότητας που οφείλεται στην υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών και ως ενισχυτής της έκφρασής τους, είναι η

RraA (Regulator of ribonuclease activity A) . Πρόκειται για μια πρωτεΐνη, η λειτουργία της οποίας διευκρινίστηκε το 2003, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου και λειτουργεί ως αναστολέας της δράσης της βασικής ενδονουκλεάσης του βακτηρίου, της RNάσης E, να αποδομεί ένα πλήθος μορίων mRNA (Lee et al., 2003). Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά κυρίως με την C-τελική περιοχή (CTD) της RNάσης E με τρόπο που δε περιλαμβάνει τη συμμετοχή νουκλεϊκών οξέων και μειώνει τα επίπεδα λειτουργίας της, μεταβάλλοντας τελικά τα επίπεδα συγκέντρωσης μιας πληθώρας mRNA στο *E. coli*. Η αναστολή αυτή φαίνεται πως δημιουργείται με έμμεσο τρόπο, καθώς η RraA ενώνεται και καλύπτει τα σημεία πρόσδεσης RNA της RNάσης E, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την πρόσδεση και κατ' επέκταση την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών των μορίων RNA (Gorna et al., 2010). Προσδένεται επίσης σε μια από τις πρωτεΐνες-μέλη του αποικοδομοσώματος (degradosome), και συγκεκριμένα στη C-τελική περιοχή της RhlB, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση RNA από την ελίκηση (Gorna et al., 2010). Η έκφρασή της φυσιολογικά συμβαίνει σε μεγαλύτερα επίπεδα κατά την είσοδο του βακτηρίου στη στατική φάση από τη φάση της εκθετικής αύξησης (Zhao et al., 2006) ενώ έχει βρεθεί ότι κατά την υπερέκφραση της RraA αυξάνονται τα επίπεδα περισσότερων από 2000 διαφορετικών mRNA μορίων μέσα στο κύτταρο. Μεταξύ αυτών, επηρεάζεται ένας σημαντικός αριθμός μεταγραφημάτων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου και στον αναερόβιο μεταβολισμό (Lee et al., 2003). Αμινοξικές ακολουθίες που να έχουν ποσοστά ομολογίας με την RraA του *E. coli*, έχουν εντοπιστεί επίσης σε αρχαία, πρωτεοβακτήρια καθώς και σε χλωροπλάστες φυτών (Lee et al., 2003). Εκτός από την RraA, στο γονιδίωμα του *E. coli*, κωδικοποιείται μια ακόμη πρωτεΐνη που λειτουργεί ως αναστολέας της δράσης της RNάσης E, η RraB, η οποία ρυθμίζει την αποδόμηση διαφορετικών mRNA μορίων μέσα στο βακτήριο. Ομόλογα της RraB έχουν βρεθεί μόνο σε γ-πρωτεοβακτήρια, γεγονός που υποδεικνύει πιθανώς μια πιο εξειδικευμένη ρύθμιση μέσω αυτής της πρωτεΐνης (Yeom et al., 2008).

Όπως αναφέρθηκε λοιπόν, βρέθηκε ότι τα βακτηριακά κύτταρα SuptoxR μπορούν μέσω της υπερέκφρασης της RraA, να καταπολεμούν την τοξικότητα που προκαλείται συχνά κατά την υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών και ταυτόχρονα να συσσωρεύουν αυξημένα επίπεδα ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Αρχικά, ερευνήθηκε το ενδεχόμενο εμφάνισης των ευεργετικών αυτών αποτελεσμάτων κατά την υπερέκφραση του άλλου αναστολέα της ενεργότητας της RNάσης E, της RraB, και βρέθηκε ότι η RraA είναι η μόνη από τις δύο πρωτεΐνες που προωθεί αποτελεσματικά την υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών (Gialama et al., 2017a) και ορθώς δεν εντοπίστηκε εξαρχής στην γενετική σάρωση της ASKA βιβλιοθήκης και η RraB.

Επιπλέον διερευνήθηκε το ενδεχόμενο της εμφάνισης των βελτιωτικών ως προς τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση ιδιοτήτων λόγω σταθεροποίησης του mRNA που παράγει τη συγκεκριμένη μεμβρανική πρωτεΐνη. Μετά από πειράματα ποσοτικής ανάλυσης PCR σε πραγματικό χρόνο, βρέθηκε ότι τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης-στόχου δεν μεταβάλλονταν σημαντικά χωρίς και με τη συνέκφραση του γονιδίου *rfaA*, γεγονός που υποδεικνύει ότι η θετική επίδραση της RraA δεν οφείλεται στην τροποποίηση του ρυθμού αποδόμησης του συγκεκριμένου mRNA (Gialama et al., 2017a). Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης της RraA και πως αυτός συνδέεται με τη δράση της RNάσης E, μελετήθηκε η υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη τα οποία έφεραν χρωμοσωμικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rne* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση RNάση E (ENS134-X). Οι μεταλλάξεις αυτές είχαν ως αποτέλεσμα την έκφραση πρωτεϊνών από τις οποίες απουσίαζε ένα διαφορετικό τμήμα της C-τελικής περιοχής της ενδονουκλεάσης, η οποία δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και είναι αυτή πάνω στην οποία προσδένονται οι διάφορες άλλες πρωτεΐνες που συνεργάζονται με την RNάση E (Leroy et al., 2002). Το σύνολο των στελεχών αυτών παρουσιάζει μειωμένη δραστικότητα αποδόμησης mRNA σε σχέση με το στέλεχος στο οποίο εκφράζεται η πλήρης εκδοχή της RNάσης E (ENS134). Η παρακολούθηση

των σχετικών επιπέδων του GFP φθορισμού ως ένδειξη της τελικής συσσώρευσης πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση της RraA στην πλειοψηφία των στελεχών που εκφράζουν τμήματα της RNάσης E, δεν προάγει τα επίπεδα υπερπαραγωγής μεμβρανοπρωτεϊνών και, επομένως, η ευεργετική επίδραση της RraA φαίνεται να επιτελείται μέσω της δράσης της RNάσης E (Gialama et al., 2017a). Ακόμη, μέσω πειραμάτων υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών με και χωρίς τη συνέκφραση του γονιδίου *rfaA* σε βακτηριακά στελέχη στα οποία έχει διαγραφεί πλήρως το γονίδιο που κωδικοποιεί μια δεύτερη βασική βακτηριακή ενδονουκλεάση, την RNάση G, έδειξε ότι η βελτιωτική επίδραση της RraA στην παραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών δεν επιτελείται μέσω της δράσης της RNάσης G (Gialama et al., 2017a).

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, φαίνεται πως η ευεργετική δράση της RraA στην προώθηση της παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με την RNάση E, αναστέλλοντας τη λειτουργία της να αποδομεί μόρια mRNA. Η αναστολή αυτή φαίνεται πως επηρεάζει έμμεσα τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση, καθώς δεν τροποποιούνται άμεσα τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης-στόχου, αλλά η αναστολή της RNάσης προκαλεί σταθεροποίηση σε ένα εύρος mRNA, μέρος των οποίων είναι πιθανό να σχετίζεται με τη βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου ή και τον αναερόβιο μεταβολισμό. Φαίνεται μάλιστα ότι η αναστολή της δράσης της RNάσης E πρέπει να συμβεί με έναν πολύ εξειδικευμένο τρόπο, καθώς ούτε η υπερέκφραση της RraB σε βακτηριακά στελέχη αγρίου τύπου, ούτε η μειωμένη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της πλειοψηφίας των στελεχών που φέρουν παραλλαγές της RNάσης E, βρέθηκαν να είναι εξίσου αποτελεσματικές συνθήκες σε σχέση με την υπερέκφραση της RraA. Είναι λοιπόν πιθανό μέσω της υπερέκφρασης της RraA να αναστέλλεται με πολύ συγκεκριμένο τρόπο η RNάση E, το οποίο οδηγεί σε σταθεροποίηση ενός συνόλου συγκεκριμένων μεταγραφημάτων και τελικά σε συσσώρευση πρωτεϊνικών παραγόντων που προωθούν την υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών (Gialama et al., 2017a).

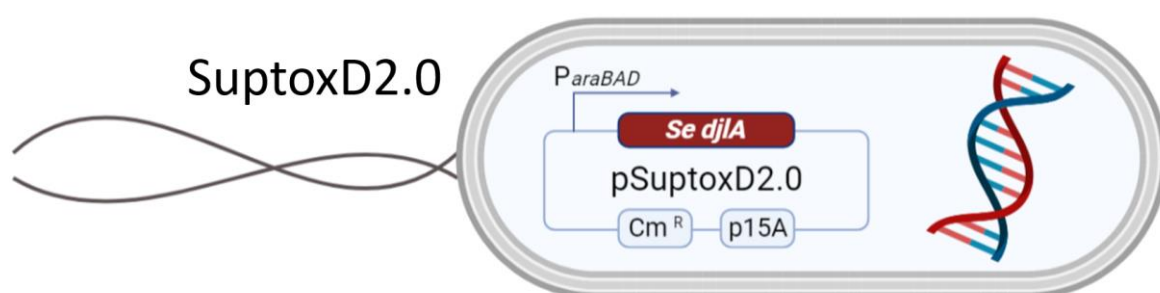
Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι ύστερα από τη διεξαγωγή πειραμάτων στα οποία είχε γίνει επαγωγή υπερέκφρασης των γονιδίων *djlA* και *rraA* ταυτόχρονα, δεν παρατηρήθηκε επιπλέον βελτίωση της παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν δρουν προσθετικά ή έστω συνεργιστικά το ένα με το άλλο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού δράσης κάθε γονιδίου, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται τελικά η αύξηση των τελικών επιπέδων συσσώρευσης βιομάζας και η μεγαλύτερη έκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών (Gialama et al., 2017a).

#### **1.12.5. Το εξελιγμένο βακτηριακό στέλεχος δεύτερης γενιάς SuptoxD2.0**

Το γονίδιο *djlA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη DjIA εντοπίζεται εκτός από το *E. coli*, στα γονιδιώματα αρνητικών κατά Gram πρωτεοβακτηρίων, όπως για παράδειγμα τα *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter gergoviae*, *Vibrio cholerae*, τα οποία είναι παθογόνα για τους ανθρώπους αλλά και για τα φυτά. Με βάση αυτό το δεδομένο, αναζητήθηκαν ομόλογα *djlA* γονίδια από άλλα πρωτεοβακτήρια που να κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που θα έχουν διαφορετικά ποσοστά ομοιότητας της αμινοξικής τους ακολουθίας σε σχέση με την *E. coli* DjIA. Κάθε ένα από τα γονίδια αυτά κλωνοποιήθηκε στον αρχικό πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pBAD33 (Guzman et al., 1995) αντικαθιστώντας το αρχικό *E. coli* *djlA* γονίδιο. Το σύνολο των ομόλογων DjIA πρωτεϊνών στη συνέχεια, ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την τοξικότητα που προκαλεί συχνά η υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών στο βακτήριο και ως προς την απόδοσή τους στην προώθηση της έκφρασης ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών (Michou et al., 2020b). Η σύγκριση των επιπέδων συσσώρευσης τελικής βιομάζας καθώς και του σχετικού GFP φθορισμού κυττάρων έδειξε ότι υπάρχει μια πληθώρα ομόλογων DjIA πρωτεϊνών που λειτουργούν επίσης ως αποτελεσματικοί καταστολείς της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας ενώ ταυτόχρονα βοηθούν την παραγωγικότητα

αυξάνοντας τα τελικά επίπεδα συγκέντρωσης ανασυνδυασμένης μεμβρανοπρωτεΐνης (Michou et al., 2020b).

Μεταξύ αυτών, εντοπίστηκε η ομόλογη DjlA πρωτεΐνη του οργανισμού *Salmonella enterica* να είναι ακόμη πιο αποτελεσματική σε σχέση με την αρχική *E. coli* DjlA. Βάσει αυτών των δεδομένων κατασκευάστηκε ένα βακτηριακό στέλεχος SuptoxD δεύτερης γενιάς, το SuptoxD2.0, το οποίο φέρει ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο *djlA* του οργανισμού *Salmonella enterica*, υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή και του μορίου-επαγωγέα του, την L(+)-αραβινόζη (Εικόνα 16). Το στέλεχος αυτό ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά του να παράγει ένα εύρος μεμβρανικών πρωτεϊνών με διαφορετικά χαρακτηριστικά (π.χ. μέγεθος, αριθμός διαμεμβρανικών ελίκων) που προέρχονταν από ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι το SuptoxD2.0 μπορεί και επιτυγχάνει υψηλά τελικά επίπεδα βιομάζας ενώ ταυτόχρονα παράγει μια πληθώρα λειτουργικών και ενσωματωμένων στη μεμβράνη μεμβρανοπρωτεϊνών σε σημαντικά αυξημένες αποδόσεις σε σχέση με το αρχικό SuptoxD στέλεχος (Michou et al., 2020b).



**Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση του βακτηριακού στελέχους SuptoxD2.0.** Το στέλεχος φέρει ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο *djlA* του οργανισμού *Salmonella enterica* υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή και του μορίου-επαγωγέα L(+)-αραβινόζη.

### 1.13. Σκοπός παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κατασκευή νέων στελεχών *E. coli* SuptoxR δεύτερης γενιάς, ικανών να καταστέλλουν ακόμη πιο αποτελεσματικά την τοξικότητα που επάγεται συχνά από τη διαδικασία της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης στο βακτήριο, και ταυτόχρονα να ενισχύουν περαιτέρω τα επίπεδα συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών καλής ποιότητας στη βακτηριακή μεμβράνη, οι οποίες θα προέρχονται τόσο από προκαρυωτικούς όσο και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε σχέση με το αρχικό στέλεχος. Επιπλέον σκοπός είναι η επίτευξη περισσότερων πληροφοριών που αφορούν τον μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνονται οι ευεργετικές ιδιότητες του στελέχους SuptoxR μέσω της μειωμένης δραστηριότητας της RNάσης E, υπό συνθήκες υπερέκφρασης της RraA.

## **Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>**

### **Ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών SuptoxR δεύτερης γενιάς**

## **2. Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2**

Το βακτηριακό στέλεχος SuptoxR αναπτύχθηκε σε προηγούμενη ερευνητική εργασία, και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην έκφραση αυξημένων ποσοτήτων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών καλής ποιότητας. Συγκεκριμένα, επιτυγχάνει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα τελικής βιομάζας καταπολεμώντας με επιτυχία την τοξικότητα που προκαλεί η υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και επιπλέον ενισχύει την παραγωγικότητα ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Ύστερα από μια συστηματική μελέτη των συνθηκών καλλιέργειας και έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες καθώς και του *rraA* γονιδίου, βρέθηκαν επίσης οι βέλτιστες συνθήκες οι οποίες μεγιστοποιούν την παραγωγικότητα του SuptoxR στελέχους, ενώ ταυτόχρονα αποδείχθηκε ότι η χρήση του επιτρέπει την παραγωγή σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας, οι οποίες είναι κατάλληλες για περαιτέρω λειτουργικές και δομικές μελέτες (Michou et al., 2019). Οι ευεργετικές ιδιότητες του στελέχους SuptoxR βασίζονται στην υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* του *E. coli*, από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pSuptoxR, ο οποίος κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RraA, έναν αναστολέα της δράσης της ενδονουκλεάσης του βακτηρίου RNάσης E να αποδομεί μόρια mRNA. Η έκφραση του γονιδίου στο πλασμίδιο αυτό έχει τεθεί υπό τον έλεγχο του υποκινητή *araBAD* και του μορίου-επαγωγέα του, την L(+)-αραβινόζη.

### **2.1. Επιλογή και αξιολόγηση ομόλογων RraA πρωτεϊνών ως καταστολείς της επαγόμενης τοξικότητας κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και ενεργοποιητές της παραγωγής τους**

Με απώτερο σκοπό την κατασκευή βακτηριακών στελεχών SuptoxR δεύτερης γενιάς, τα οποία θα επιδεικνύουν περαιτέρω βελτιωμένες αποδόσεις, κατευνάζοντας την τοξικότητα που

προκαλεί η μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση και ενισχύοντας τα επίπεδα συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, αναζητήθηκαν φυσικές παραλλαγές της RraA με παρόμοιες ή και καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με την RraA του *E. coli* που εκφράζεται στο αρχικό στέλεχος. Η RraA είναι μια πρωτεΐνη ομόλογα της οποίας εντοπίζονται εκτός από το *E. coli*, στα γονιδιώματα των αρχαίων, των πρωτεοβακτηρίων καθώς και στους χλωροπλάστες των φυτών (Lee et al., 2003). Με βάση αυτό το δεδομένο, αναζητήθηκαν αρχικά βακτηριακά και φυτικά γονιδιώματα τα οποία κωδικοποιούσαν για αντίστοιχα *rraA* γονίδια, και επιλέχθηκε ένα πλήθος από αυτά που κωδικοποιεί για ομόλογες RraA πρωτεΐνες. Η επιλογή αυτή πραγματοποιήθηκε με γνώμονα τα ποσοστά ομοιότητας της αμινοξικής ακολουθίας κάθε ομόλογης RraA πρωτεΐνης με την RraA του *E. coli* που κωδικοποιείται στο στέλεχος SuptoxR, καταλήγοντας σε ένα σύνολο ομόλογων πρωτεϊνών που διαθέτουν υψηλό (>85 %), ενδιάμεσο (65-85 %) και χαμηλό (<65 %) ποσοστό ομολογίας (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1: Φυσικές παραλλαγές της RraA που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στο πλαίσιο αυτής της ερευνητικής εργασίας**

| Οργανισμός                   | Μήκος<br>(αμινοξέα) | Ποσοστό<br>ταύτισης<br>ακολουθίας με<br>την RraA του<br>SuptoxR | Ποσοστό<br>ομοιότητας<br>ακολουθίας με την<br>RraA του<br>SuptoxR | Αναφορά                                                                                                |
|------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>      | 162                 | 100%                                                            | 100%                                                              | Γονιδιωματικό cDNA<br>(Gialama et al., 2017b)                                                          |
| <i>Salmonella enterica</i>   | 162                 | 96.9%                                                           | 98.8%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(Pullinger et al., 2008)                                                         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 162                 | 93.8%                                                           | 99.4%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(ευγενική προσφορά της<br>Δρ. Βιβής Μυριαγκού,<br>Ελληνικό Ινστιτούτο<br>Παστέρ) |

| Οργανισμός                         | Μήκος<br>(αμινοξέα) | Ποσοστό<br>ταύτισης<br>ακολουθίας με<br>την RraA του<br>SuptoxR | Ποσοστό<br>ομοιότητας<br>ακολουθίας με την<br>RraA του<br>SuptoxR | Αναφορά                                                                                                |
|------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Enterobacter<br/>gergoviae</i>  | 162                 | 91.4%                                                           | 98.8%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(ευγενική προσφορά της<br>Δρ. Βιβής Μυριαγκού,<br>Ελληνικό Ινστιτούτο<br>Παστέρ) |
| <i>Enterobacter<br/>cloacae</i>    | 162                 | 93.2%                                                           | 99.4%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(ευγενική προσφορά της<br>Δρ. Βιβής Μυριαγκού,<br>Ελληνικό Ινστιτούτο<br>Παστέρ) |
| <i>Serratia<br/>marcescens</i>     | 162                 | 89.5%                                                           | 95.7%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(ευγενική προσφορά της<br>Δρ. Βιβής Μυριαγκού,<br>Ελληνικό Ινστιτούτο<br>Παστέρ) |
| <i>Proteus<br/>mirabilis</i>       | 173                 | 77.5%                                                           | 87.3%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(Jones et al., 1990)                                                             |
| <i>Providencia<br/>stuartii</i>    | 174                 | 77.0%                                                           | 85.1%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(ευγενική προσφορά της<br>Δρ. Βιβής Μυριαγκού,<br>Ελληνικό Ινστιτούτο<br>Παστέρ) |
| <i>Acinetobacter<br/>baumannii</i> | 143                 | 45.1%                                                           | 62.3%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(ευγενική προσφορά της<br>Δρ. Βιβής Μυριαγκού,<br>Ελληνικό Ινστιτούτο<br>Παστέρ) |
| <i>Arabidopsis<br/>thaliana</i>    | 167                 | 40.5%                                                           | 61.3%                                                             | Συνθετικό γονίδιο<br>(Genscript Corp.)                                                                 |

| Οργανισμός             | Μήκος<br>(αμινοξέα) | Ποσοστό<br>ταύτισης<br>ακολουθίας με<br>την RraA του<br>SuptoxR | Ποσοστό<br>ομοιότητας<br>ακολουθίας με την<br>RraA του<br>SuptoxR | Αναφορά                                 |
|------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Malus domestica</i> | 166                 | 41.7%                                                           | 59.5%                                                             | Γονιδιωματικό cDNA<br>(παρούσα εργασία) |

Εξαιτίας του γεγονότος ότι η διαθεσιμότητα πληροφοριών σχετικά με τη λειτουργία των πρωτεϊνών RraA, καθώς και με τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της δομής και της λειτουργίας τους, είναι εξαιρετικά περιορισμένη, η επιλογή των ομόλογων RraA πρωτεϊνών βασίστηκε αποκλειστικά στο κριτήριο της ύπαρξης ποικίλων ποσοστών ομολογίας των αμινοξικών ακολουθιών σε σχέση με την RraA του *E. coli*. Μεταξύ των ακολουθιών που επιλέχθηκαν τελικά, οι περιοχές στις οποίες ανιχνεύεται μεγαλύτερη ποικιλομορφία είναι τα δύο άκρα, δηλαδή οι C- και η N-τελική περιοχή. Στις περιοχές αυτές εντοπίζονται επιπλέον σημαντικές διαφορές ως προς το μήκος της κάθε ακολουθίας (**Εικόνα 17**). Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι όλες οι RraA ακολουθίες που επιλέχθηκαν προς μελέτη, ανεξάρτητα από τα επίπεδα ομολογίας με την αρχική πρωτεΐνη ή την προέλευσή τους (βακτηριακή ή φυτική), διαθέτουν μερικά απολύτως συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα σε όλο το μήκος της ακολουθίας. Παρά τον μεγάλο βαθμό συντήρησής τους όμως για τις πρωτεΐνες που προέρχονται από τους διαφορετικούς οργανισμούς, δεν υπάρχουν καθόλου πληροφορίες ως προς το πως τα αμινοξέα αυτά ενδεχομένως επηρεάζουν τη λειτουργικότητα της RraA.

Για κάθε ένα από τα ομόλογα *rraA* γονίδια που επιλέχθηκαν, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του αντίστοιχου γονιδίου μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια κάθε γονίδιο κλωνοποιήθηκε στον αρχικό πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pSuptoxR, αντικαθιστώντας το *rraA* γονίδιο του *E. coli*,

και μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασής τους στην καταπολέμηση της τοξικότητας που επάγεται συχνά κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς και στην προώθηση της παραγωγικότητας σε μεμβρανοπρωτεΐνες. Σημειώνεται πως, εκτός από την περίπτωση του *rraA* γονιδίου από τον φυτικό οργανισμό *Arabidopsis thaliana* το οποίο παράχθηκε συνθετικά σε μορφή που χρησιμοποιούσε βελτιωμένα ως προς το *E. coli* κωδικόνια (codon optimization) χωρίς να μεταβάλλεται η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται, σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις η ακολουθία που κλωνοποιήθηκε αντιστοιχεί σε αυτή που εκφράζεται ενδογενώς σε κάθε οργανισμό.

Ως μεμβρανική πρωτεΐνη-μοντέλο της οποίας η υπερέκφραση έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξική για το βακτήριο (Link et al., 2008), χρησιμοποιήθηκε ο υποδοχέας της βραδυκινίνης 2 (BR2). Η BR2, όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των GPCRs και έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανάπτυξη του αρχικού βακτηριακού στελέχους SuptoxR (Gialama et al., 2017b). Επιπλέον, η BR2 εκφράστηκε ως ένωση στο C-τελικό της άκρο με την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) (**Εικόνα 12**). Η στρατηγική αυτή ακολουθήθηκε προκειμένου να διευκολυνθεί η γρήγορη παρακολούθηση των σχετικών επιπέδων συσσώρευσης της μεμβρανοπρωτεΐνης στη μεμβράνη του κυττάρου, καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα φθορισμού κυττάρων *E. coli* που εκφράζουν μια τέτοια πρωτεϊνική χίμαιρα μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης με τη GFP, είναι ανάλογα των επιπέδων στα οποία η πρωτεΐνη αυτή παράγεται και εισέρχεται στη μεμβράνη (Drew et al., 2001). Έτσι, μετρώντας το συνολικό φθορισμό βακτηριακών κυττάρων που παράγουν χιμαιρικές κατασκευές μεμβρανικών πρωτεϊνών με την GFP, είναι δυνατή η συσχέτιση των σχετικών επιπέδων στα οποία η εκάστοτε διαμεμβρανική πρωτεΐνη παράγεται και εισέρχεται στη μεμβράνη, συγκρίνοντας για παράδειγμα τα επίπεδα παραγωγικότητας βακτηρίων που έχουν καλλιεργηθεί υπό διαφορετικές συνθήκες.

Η επίδραση της υπερέκφρασης κάθε ομόλογης RraA πρωτεΐνης στην καταστολή της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας αξιολογήθηκε μέσω της καταγραφής της τελικής πυκνότητας βακτηριακών καλλιεργειών MC1061 κυττάρων που υπερεκφράζουν την πρωτεϊνική χίμαιρα BR2-GFP, χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση των ομόλογων *rraA* γονιδίων. Τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας υπολογίστηκαν με βάση την οπτική πυκνότητα στα 600 nm (optical density, OD<sub>600</sub>) κάθε καλλιέργειας, μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης. Όπως φαίνεται και στην **(Εικόνα 18)**, εκτός από τα ομόλογα γονίδια από τους οργανισμούς *Enterobacter cloacae* και *Malus domestica*, η συνέκφραση όλων των υπόλοιπων ομόλογων *rraA* γονιδίων οδήγησε σε αύξηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας σε ποσοστά που κυμαίνονταν από 45-165 %. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει σημαντική μείωση στα επίπεδα τοξικότητας που προκαλούνται κατά την υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP σε αυτές τις καλλιέργειες.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το ποσοστό συσσώρευσης ανασυνδυασμένης μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP σε μεμονωμένα κύτταρα *E. coli* που προέρχονται από κάθε καλλιέργεια στην οποία συνεκφράζεται ένα από τα ομόλογα *rraA* γονίδια, μέσω μέτρησης του GFP φθορισμού με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής έδειξαν ότι η πλειοψηφία των επιλεγμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών ήταν επίσης ικανές να βελτιώσουν τα επίπεδα φθορισμού μεμονωμένων κυττάρων που παράγουν την πρωτεΐνη BR2-GFP, υποδεικνύοντας ότι στα κύτταρα αυτά υπάρχει αυξημένη παραγωγικότητα σε BR2-GFP, η οποία βρίσκεται ενσωματωμένη στη μεμβράνη, σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία δε συνεκφράζεται κάποια από τις RraA πρωτεΐνες **(Εικόνα 19)**.

|                      | 1              | 10    | 20             | 30           | 40              | 50   |  |
|----------------------|----------------|-------|----------------|--------------|-----------------|------|--|
| <i>E. coli</i>       | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | EDVNVVEPLFSNFG | GRASFGGQIITV | KCFEDNGLLYDL    | LEQN |  |
| <i>S. enterica</i>   | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | EDVNVVEPLFSNFG | GRSSFGGQIITV | KCFEDNGLLYDL    | LEQN |  |
| <i>K. pneumoniae</i> | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | EDVNVVEPLFSNFG | GRSSFGGQIITV | KCFEDNGLLYDL    | LEQN |  |
| <i>E. gergoviae</i>  | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | EDVNVVEPLFSNFG | GRSSFGGQIITV | KCFEDNGLLYDM    | LEEN |  |
| <i>E. cloacae</i>    | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | EDVNVVEPLFSNFG | GRSSFGGQIITV | KCFEDNGLLYDL    | LEQN |  |
| <i>S. marcescens</i> | .MKYDTSELCDIYH | ..... | EEVNVVEPLFSNFG | GRTSFGGQIITV | KCFEDNGLLFDL    | LEEN |  |
| <i>P. mirabilis</i>  | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | EDINVVEPLFSNFG | GRSSFGGQIITV | KCFEDNGLLYDL    | LEEN |  |
| <i>P. stuartii</i>   | .MKYDTSELCDIYQ | ..... | ESVNVVEPLFSNFG | GRTSFGGQIITV | KCFEDNGLLYDL    | LEED |  |
| <i>A. baumannii</i>  | .....          | ..... | MDGKFFKSYGAR   | QTFFGQVTV    | KCFEDNSRVKEL    | LATD |  |
| <i>A. thaliana</i>   | MAFVTTAEVCDANQ | EMIRS | GQLRALQPVFQIY  | GRQIFSGP     | VTVKVFEDNGLIRHF | LEEK |  |
| <i>M. domestica</i>  | MALVTTAEVCDAS  | QLIGS | GDLRVLEPIFQIY  | GRQVFSGQIV   | TLKXFEDNVLVRSE  | LEEK |  |

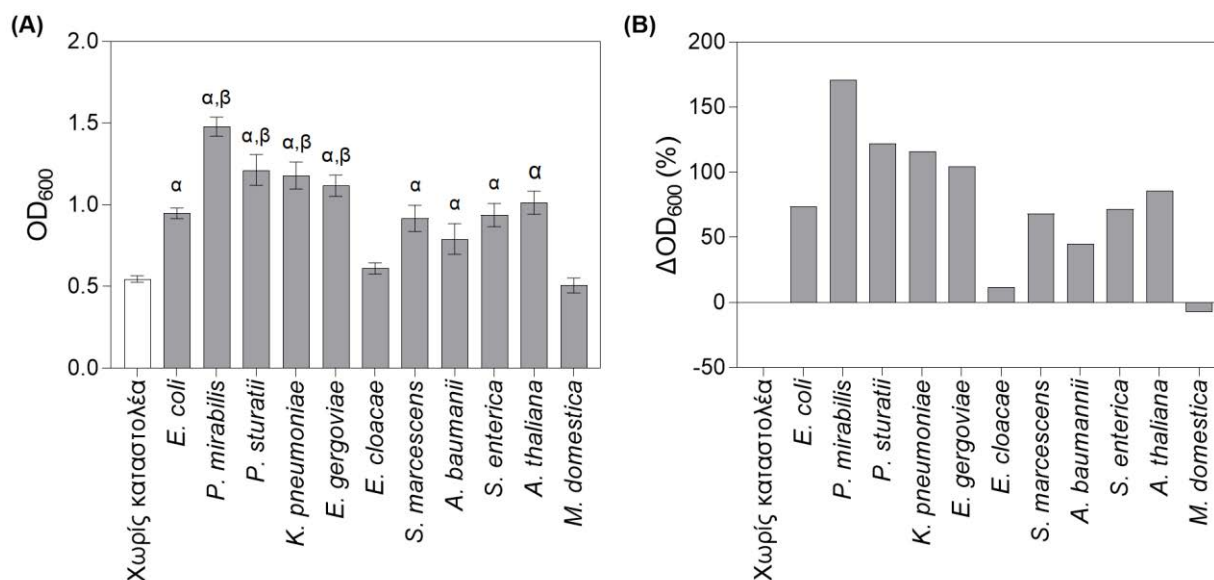
  

|                      | 60                   | 70            | 80                  | 90            | 100            | 110 |  |
|----------------------|----------------------|---------------|---------------------|---------------|----------------|-----|--|
| <i>E. coli</i>       | GRGRVLLVDGGGSVRRALV  | DAELARLAVQN   | EWEGLVIIYGAVRQVDDLE | ELDIGIQAMAAIP |                |     |  |
| <i>S. enterica</i>   | GRGRVLLVDGGGSVRRALV  | DAELARLATQN   | EWEGLVIIYGAVRQVDDLE | ELDIGIQAIIP   |                |     |  |
| <i>K. pneumoniae</i> | GRGRIILLVDGGGSVRRALV | DADLARLAVQN   | EWEGLVIIYGAVRQVDDLE | ELDIGIQALAAIP |                |     |  |
| <i>E. gergoviae</i>  | GRGRIILLVDGGGSVRRALV | DADLGKLAVQN   | EWEGIVVYGAVRQVDDLE  | ELDLGIQALAAIP |                |     |  |
| <i>E. cloacae</i>    | GRGRVLLVDGGGSVRRALV  | DAELAGIIVQN   | EWEGIVVYGAVRQVDDLE  | ELDLGIQAIIP   |                |     |  |
| <i>S. marcescens</i> | GRGRVLLVDGGGSVRRALV  | DAELARLAAQN   | EWEGIVVYGAVRQVDDLE  | ELDIGIQAMAAIP |                |     |  |
| <i>P. mirabilis</i>  | GKDRILLVDGGGSVRRALV  | DAELAQVLVN    | EWEGIVVYGAVRQVDDLE  | ELDLGIQAMAAIP |                |     |  |
| <i>P. stuartii</i>   | GHGRILLVDGGGSVRRALV  | DAELARLAVDN   | EWEGIVVYGAVRQVDDLE  | ELDLGIQAIIP   |                |     |  |
| <i>A. baumannii</i>  | GTGKVLVVDDGGASMR     | CALMGDMIAES   | AVKNNWNGVVIYGC      | VRDVALATL     | DLGVHALAAIP    |     |  |
| <i>A. thaliana</i>   | GNGRVLLVDGGGSRL      | CAILGPNPVVQAQ | NNGWAGIIVNGC        | IRDVDEIN      | GCIDIGVRALASHP |     |  |
| <i>M. domestica</i>  | GNGRVLLVDGGGSKRC     | AILGPNPVVQAQ  | NNGWAGIIVNGC        | IRDVDEIN      | GCIDIGVRALAAHP |     |  |

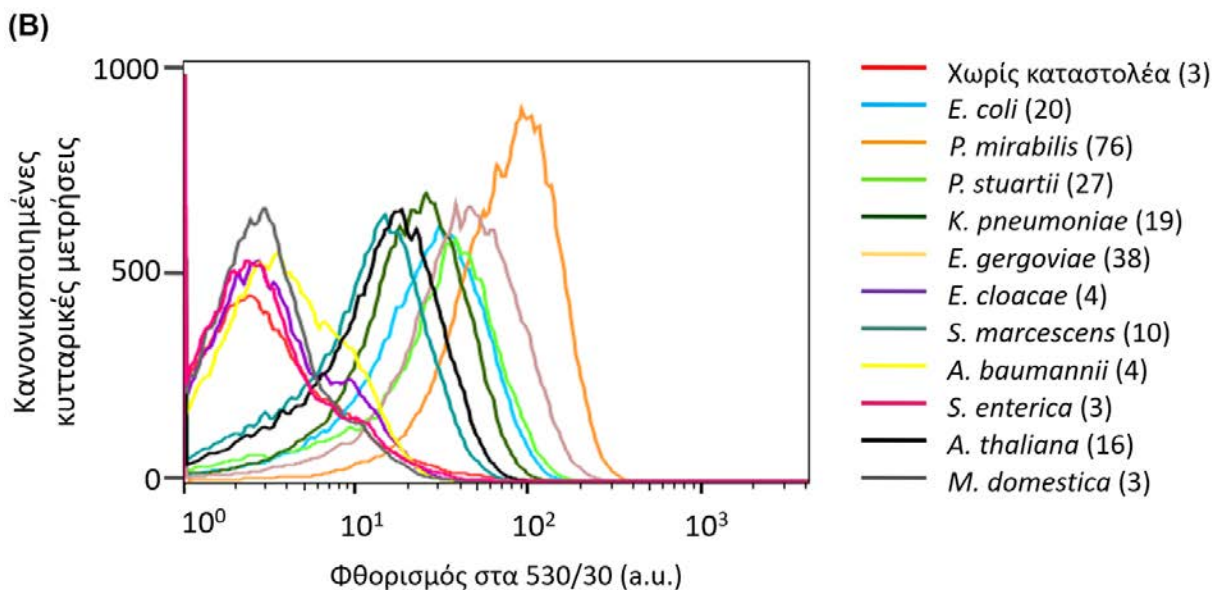
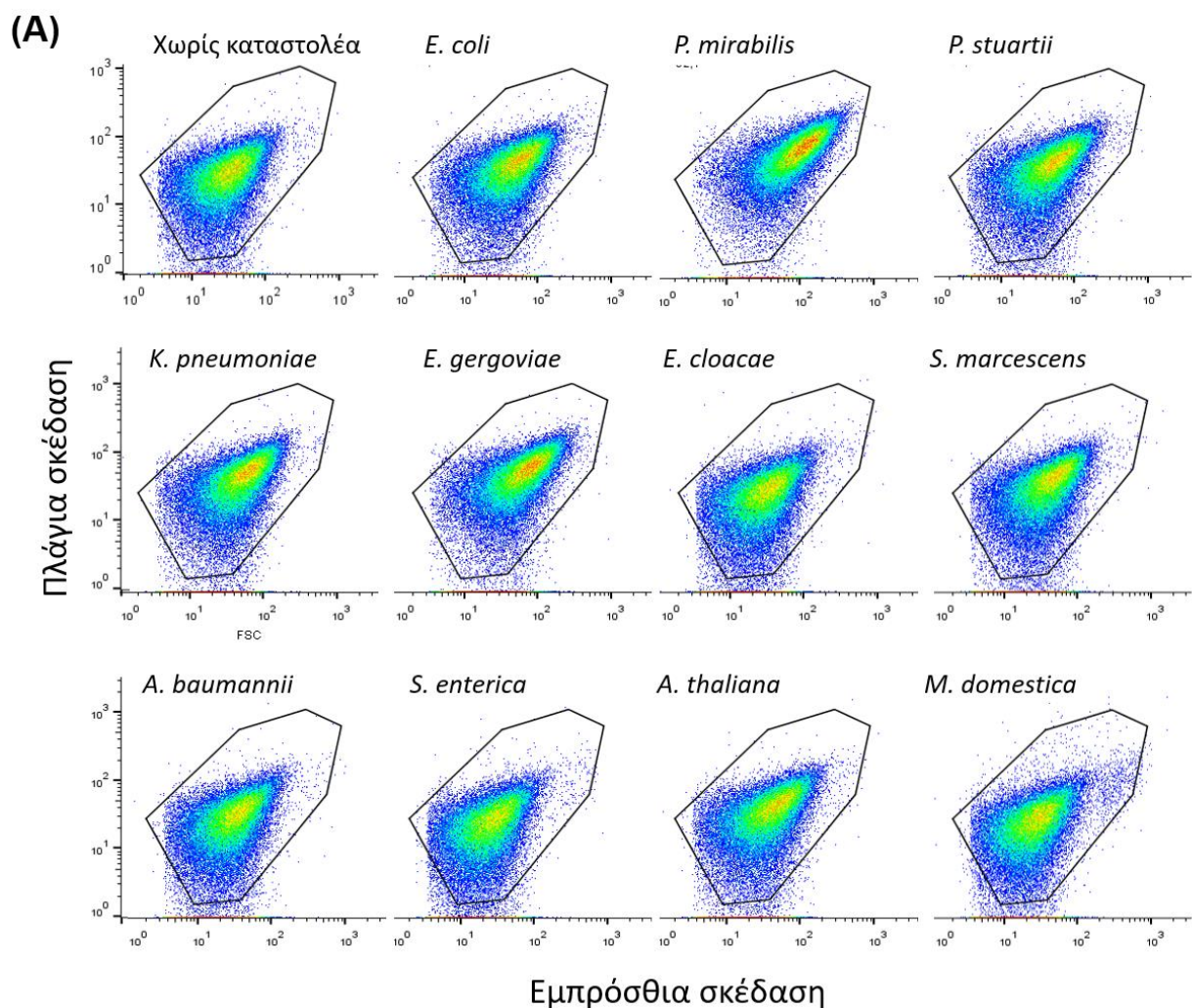
  

|                      | 120                | 130          | 140           | 150           | 160          |  |
|----------------------|--------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--|
| <i>E. coli</i>       | VGAAGEGIGESDVRVNF  | GGVTFFSGDHL  | LYADNTGIILSED | PLDIES        | .....        |  |
| <i>S. enterica</i>   | VGAAGEGIGESDVRVNF  | GGVTFFSGDHL  | LYADNTGIILSED | PLDIE         | .....        |  |
| <i>K. pneumoniae</i> | VGAAGEGIGESDVRVNF  | GGVTFFSGDHL  | LYADNTGMILSED | PLDIES        | .....        |  |
| <i>E. gergoviae</i>  | VGAAGEGIGESDVRVNF  | GGVTFFSGDHL  | LYADNTGIILSED | ALDIES        | .....        |  |
| <i>E. cloacae</i>    | VGAAGEGIGESDIRVNF  | GGVTFFSGDHL  | LYADNTGIILSED | PLDIES        | .....        |  |
| <i>S. marcescens</i> | AGAVSEGVGESDIRVNF  | GGVTFFSGDHL  | LYADNTGIILSED | PLDIES        | .....        |  |
| <i>P. mirabilis</i>  | AGCPSEBGIGESDIRVNF | GGVTFFSGDY   | LYADNTGIILSEE | PLGLDDDD      | ...LDDDLLEES |  |
| <i>P. stuartii</i>   | AGCPDEBGIGESDIRVNF | GGVTFFSGDY   | LYADNTGIILSEE | PLSTQDGSEFEVL | DDDL         |  |
| <i>A. baumannii</i>  | QKSNRRKIGIEVDIPLY  | FGGVVTIQSGDF | IYADNNGIVIAKE | KLVS          | .....        |  |
| <i>A. thaliana</i>   | IKASKKGLGEQRVSLN   | IAGTRICDGEW  | LYADTDGILVSQ  | IELSVS        | .....        |  |
| <i>M. domestica</i>  | MKANRKGIGEKQVPIS   | IAGTRICDGEW  | LYADTDGILISRT | ELSV          | .....        |  |

Εικόνα 17: Σύγκριση των ακολουθιών των ομόλογων RraA πρωτεϊνών που μελετήθηκαν σε σχέση με την RraA του *E. coli*. Πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών των ομόλογων RraA πρωτεϊνών που μελετήθηκαν. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει τα απολύτως συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ το κίτρινο τα παρόμοια. Η πολλαπλή στοίχιση πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Clustal Omega και η απεικόνιση με το ESPript.



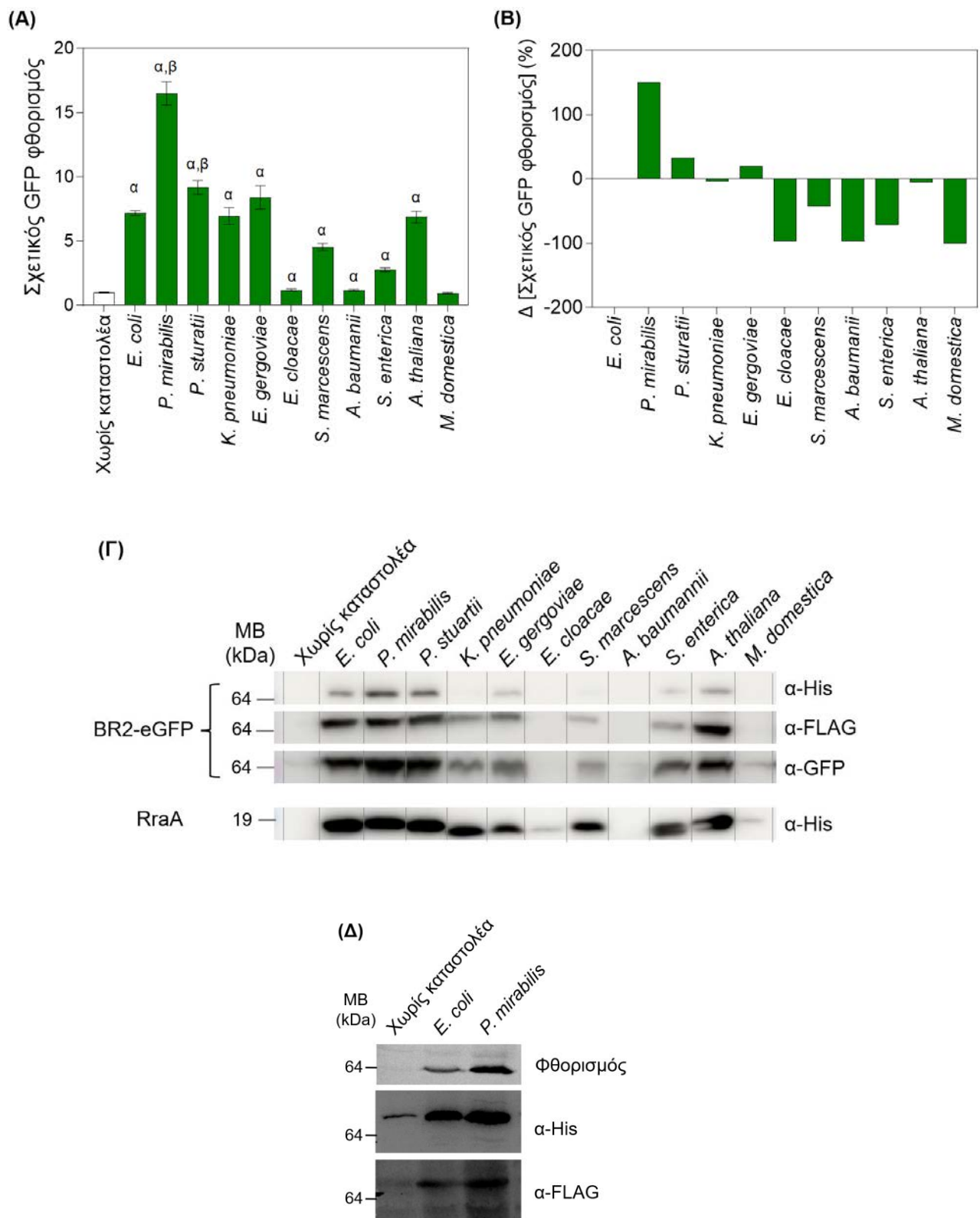
**Εικόνα 18: Η συνέκφραση της πλειοψηφίας των ομόλογων RraA πρωτεϊνών βακτηριακής και φυτικής προέλευσης καταστέλλει την τοξικότητα που επάγεται κατά την υπερέκφραση της χμαιρικής μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP, αυξάνοντας τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας.** (A) Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm σε ίσο όγκο καλλιιεργειών MC1061 κυττάρων που παράγουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP μετά από προσθήκη 0.2  $\mu\text{g/mL}$  aTc, χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση των διαφορετικών RraA πρωτεϊνών βακτηριακής και φυτικής προέλευσης μετά από προσθήκη 0.2 % (w/v) L(+)-αραβινόζης για 16 ώρες στους 25 °C. (B) Ποσοστό αύξησης της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm για τις ίδιες καλλιέργειες, σε σχέση με την καλλιέργεια στην οποία δεν εκφράζεται κάποια RraA πρωτεΐνη, σύμφωνα με τον τύπο  $\Delta\text{OD} (\%) = [(\text{OD καλλιέργειας με συνέκφραση κάποιου } rraA \text{ γονιδίου} - \text{OD καλλιέργειας χωρίς καταστολέα}) / \text{OD καλλιέργειας χωρίς καταστολέα}] \times 100$ . Οι τιμές που αναφέρονται στα διαγράμματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν  $\pm$  s.e.m. Το α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με το δείγμα χωρίς καταστολέα, ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με το δείγμα στο οποίο υπερεκφράζεται η RraA του *E. coli*.



**Εικόνα 19:** Η συμπαραγωγή ορισμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών αυξάνει την παραγωγικότητα μεμονωμένων *E. coli* κυττάρων σε ενσωματωμένη στη μεμβράνη BR2-GFP. (A) Διάγραμμα εμπρόσθιας και πλάγιας σκέδασης βακτηριακών κυττάρων MC1061 που

παράγουν την πρωτεϊνική χίμαιρα BR2-GFP με ή χωρίς (χωρίς καταστολέα) την ταυτόχρονη συνέκφραση των διαφορετικών ομόλογων *rraA* γονιδίων, μετά την προσθήκη 0.2 % (w/v) L(+)-αραβινόζης και 0.2  $\mu\text{g/mL}$  ανυδροτετρακυκλίνης για 16 ώρες στους 25 °C. (B) Φθορισμός μεμονωμένων κυττάρων *E. coli* MC1061 στα οποία παράγεται η μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP παρουσία ή απουσία καταστολέα, όπως μετρήθηκαν με χρήση κυτταρομετρίας ροής.

Ο συνδυασμός της αυξημένης κυτταρικής πυκνότητας και της ενισχυμένης ανά κύτταρο παραγωγικότητας σε μεμβρανοπρωτεΐνη που παρατηρείται στις περισσότερες καλλιέργειες στις οποίες συνεκφράζεται κάποια από τις ομόλογες RraA πρωτεΐνες μαζί με τη χιμαιρική κατασκευή BR2-GFP, οδήγησε τελικά σε ιδιαίτερα ενισχυμένα επίπεδα σχετικού GFP φθορισμού που προκύπτει μετρώντας το συνολικό φθορισμό ίσου όγκου καλλιέργειας, για την πλειοψηφία των ομόλογων *rraA* γονιδίων που ελέγχθηκαν. Με εξαίρεση τα *rraA* γονίδια από τους οργανισμούς *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* και *Malus domestica* των οποίων η συνέκφραση δεν επηρέασε σχεδόν καθόλου ή επέφερε ιδιαίτερα μικρή αύξηση στον φθορισμό, η υπερέκφραση όλων των υπολοίπων ομόλογων *rraA* γονιδίων οδήγησε σε σημαντική αύξηση (3 έως και 17 φορές μεγαλύτερος φθορισμός) του σχετικού φθορισμού ίσου όγκου καλλιεργειών που εκφράζουν την πρωτεΐνη BR2-GFP. Επιπλέον, μέσω των αποτελεσμάτων της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE) σε συνδυασμό με ανοσοαποτύπωση κατά western (western blot), επιβεβαιώθηκε ότι ο αυξημένος GFP φθορισμός που εντοπίστηκε στις καλλιέργειες που υπερεκφράζουν συγκεκριμένα *rraA* γονίδια, οφείλεται όντως στα αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης της μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP (**Εικόνα 20 Α, Β**).



**Εικόνα 20:** Η συνέκφραση ομόλογων RraA πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη BR2-GFP οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της μεμβρανοπρωτεΐνης ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας σε επίπεδα όμοια ή και υψηλότερα σε σχέση με την RraA του *E. coli*. (A) Σχετικός GFP

φθορισμός ίσου όγκου καλλιεργειών *E. coli* MC1061 κυττάρων που παράγουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση του συνόλου των ομόλογων *rraA* γονιδίων. (B) ποσοστιαία αύξηση του σχετικού GFP φθορισμού της κάθε καλλιέργειας σε σύγκριση με το φθορισμό της καλλιέργειας των SuptoxR κυττάρων (*E. coli*), όπου  $\Delta[\text{σχετικός GFP φθορισμός}] (\%) = [(\text{φθορισμός GFP καλλιεργειών που συνεκφράζουν κάποιο από τα ομόλογα } rraA \text{ γονίδια} - \text{φθορισμός GFP καλλιέργειας που συνεκφράζει το γονίδιο } rraA \text{ του } E. coli) / \text{φθορισμός GFP καλλιέργειας που συνεκφράζει το γονίδιο } rraA \text{ του } E. coli] \times 100$ . (Γ) Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά western ολικού κλάσματος ίσου όγκου καλλιεργειών MC1061 κυττάρων που συνεκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP απουσία καταστολέα (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση των ομόλογων *rraA* γονιδίων. Οι ζώνες που αντιστοιχούν στην μεμβρανοπρωτεΐνη καθώς και στις διαφορετικές RraA πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με χρήση των αντισωμάτων α-His, α-FLAG και α-GFP. (Δ) Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες (φθορισμός) και υπό αποδιατακτικές συνθήκες (μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά western, α-His και α-FLAG) κλασμάτων ολικών μεμβρανών που απομονώθηκαν από ίσο όγκο καλλιέργειας MC1061 κυττάρων που παράγουν την πρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς και με τη συνέκφραση των γονιδίων *rraA* από τους οργανισμούς *E. coli* και *P. mirabilis*. Στο (Α) οι αναφερόμενες τιμές προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφαλμάτων αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m. Το α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά του μέσου όρου της τιμής του φθορισμού κάθε καλλιέργειας σε σχέση με το δείγμα «χωρίς καταστολέα» ( $p < 0.05$ ), ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα «*E. coli*» ( $p < 0.05$ ).

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα επίπεδα συσσώρευσης των διαφορετικών RraA πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα του *E. coli*, επηρεάζουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της συνέκφρασης των αντίστοιχων *rraA* γονιδίων στην προώθηση της απόδοσης παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, τα *rraA* γονίδια από τους οργανισμούς *Enterobacter cloacae*, *Malus domestica* και *Acinetobacter baumannii*, τα οποία είχαν μικρή ή καθόλου επίδραση στην παραγωγικότητα της μεμβρανικής πρωτεΐνης, είχαν επίσης πολύ μικρά ποσοστά συσσώρευσης της αντίστοιχης RraA στο εσωτερικό των

βακτηρίων, όπως αυτό ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Αντίθετα, όλα τα υπόλοιπα *rraA* γονίδια, των οποίων η υπερέκφραση βρέθηκε πως είναι ιδιαίτερα ευεργετική ενισχύοντας την παραγωγή των μεμβρανικών πρωτεϊνών, εξέφραζαν τις αντίστοιχες RraA πρωτεΐνες οι οποίες συσσωρεύονταν σε μεγαλύτερο βαθμό στο *E. coli* και το σήμα τους μπορούσε να εντοπιστεί καθαρά στην ανάλυση κατά western (**Εικόνα 20 Γ, Δ**). Τεχνικές όπως η χρήση βελτιωμένων ως προς το *E. coli* κωδικονίων για τα *rraA* γονίδια που δεν εκφράζονται επαρκώς ή κάποιες επιπλέον τροποποιήσεις των συνθηκών έκφρασής τους, είναι πιθανό να μπορούν να ενισχύσουν την ικανότητά των αντίστοιχων RraA πρωτεϊνών, που συσσωρεύονται σε πολύ χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, να προωθούν την παραγωγικότητα μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι κατά την υπερέκφραση του *rraA* γονιδίου από τον οργανισμό *Arabidopsis thaliana*, το οποίο ήταν το μόνο από όσα χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη που διέθετε κωδικόνια βελτιωμένα ως προς την έκφραση στο *E. coli*, παράχθηκε επαρκής ποσότητα RraA πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε στην ανάλυση ανοσοαποτυπώματος κατά western και είχε επίσης θετική επίδραση στην έκφραση ανασυνδυασμένης BR2-GFP.

Έτσι, εξαιτίας των διαφορετικών επιπέδων συσσώρευσης που ανιχνεύθηκαν για κάθε ομόλογη RraA πρωτεΐνη, και ελλείψει γνώσης για τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο η υπερέκφραση των RraA πρωτεϊνών επηρεάζει το σύνολο των μεταγραφημάτων του κυττάρου, δε μπορούμε να συγκρίνουμε απευθείας την αποτελεσματικότητα των διαφορετικών RraA πρωτεϊνών. Η μελέτη όμως της επίδρασης της συνέκφρασης των διαφορετικών *rraA* γονιδίων στην τελική πυκνότητα των διαφορετικών καλλιεργειών που υπερεκφράζουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη, καθώς επίσης και στην προώθηση της συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, οδηγεί στον εντοπισμό ομόλογων RraA των οποίων η ικανότητα να καταστέλλουν την επαγόμενη τοξικότητα και να αυξάνουν την παραγωγικότητα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι παρόμοια με την αρχική RraA του οργανισμού *E. coli*. Τέτοιες ομόλογες RraA πρωτεΐνες είναι για

παράδειγμα αυτές από τους οργανισμούς *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter gergoviae* και *Arabidopsis thaliana*.

## **2.2. Η συνέκφραση των RraA πρωτεϊνών από τους οργανισμούς *P. mirabilis* και *P. stuartii* οδηγεί συχνά σε περαιτέρω αυξήσεις της βακτηριακής παραγωγικότητας σε ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες σε σχέση με την RraA του *E. coli*.**

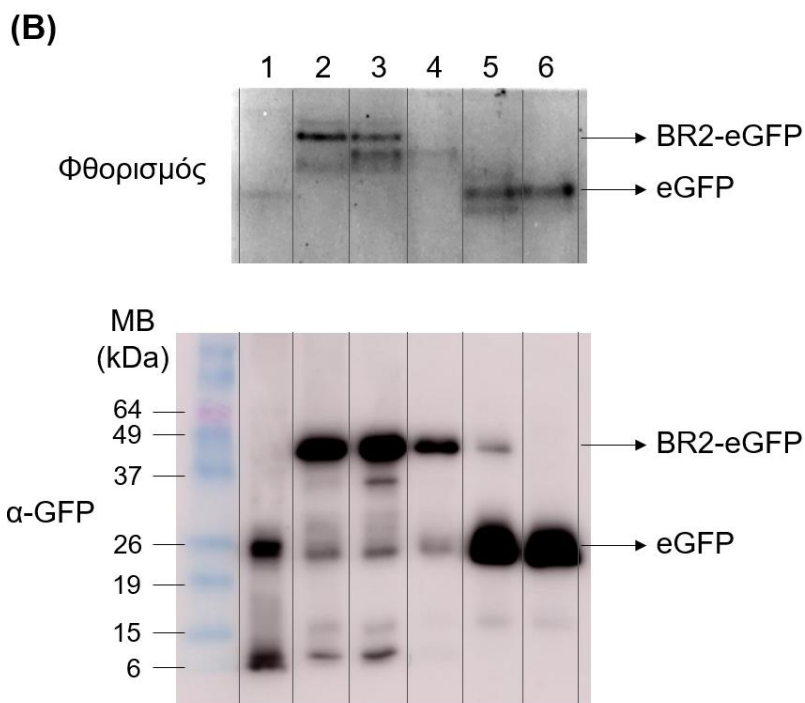
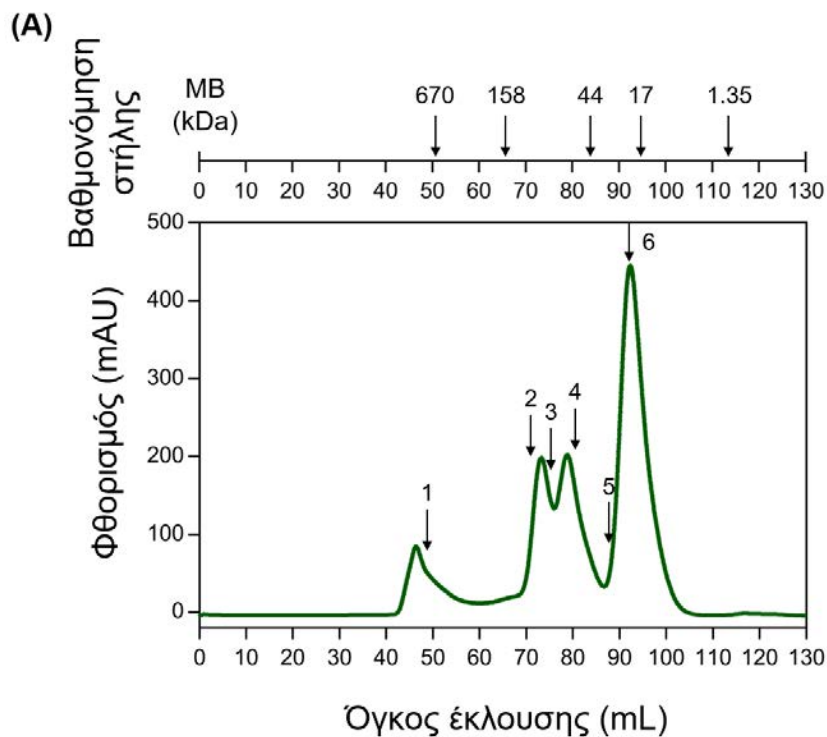
Η μελέτη της αποτελεσματικότητας των διαφορετικών φυσικών παραλλαγών της RraA του *E. coli* ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν την παραγωγικότητα των βακτηριακών κυττάρων σε ανασυνδυασμένη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2, οδήγησε στον εντοπισμό ομόλογων RraA πρωτεϊνών των οποίων η ισχύς ήταν εφάμιλλη ή και ακόμη υψηλότερη σε σύγκριση με την RraA του *E. coli* (EcRraA) που κωδικοποιείται στο αρχικό στέλεχος SuptoxR (**Εικόνα 18**, **Εικόνα 19**, **Εικόνα 20**). Μεταξύ αυτών, οι RraA πρωτεΐνες από τους οργανισμούς *Proteus mirabilis* (PmRraA) και *Providencia stuartii* (PsRraA) βρέθηκαν να είναι οι πιο αποτελεσματικές, ξεπερνώντας σε απόδοση την εγγενή EcRraA του SuptoxR. Συγκεκριμένα, η έκφραση των PmRraA και PsRraA οδήγησε σε επιπλέον καταπολέμηση της κυτταροτοξικότητας που επάγεται από την παραγωγή της BR2, όπως φαίνεται από την τελική συγκέντρωση των καλλιέργειών που σχηματίστηκαν οι οποίες είχαν 52 % και 24 % υψηλότερη οπτική πυκνότητα στα 600 nm αντίστοιχα (**Εικόνα 18**), σε σχέση με την καλλιέργεια των SuptoxR κυττάρων στα οποία εκφράζεται η ίδια μεμβρανική πρωτεΐνη. Επιπλέον στις ίδιες καλλιέργειες η συνέκφραση των δυο ομόλογων RraA πρωτεϊνών αύξησε περαιτέρω την παραγωγικότητα σε ανασυνδυασμένη BR2, τόσο σε επίπεδο μεμονωμένου κύτταρου (280 % και 35 % υψηλότερος ανά κύτταρο φθορισμός, αντίστοιχα **Εικόνα 19**) όσο και ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας (110 % και 18 % υψηλότερος φθορισμός ίσου όγκου καλλιέργειας, αντίστοιχα **Εικόνα 20**).

Η ανάλυση SDS-PAGE που συνδυάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western, εκτός από πληροφορίες που παρέχει σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης της ανασυνδυασμένης BR2-GFP σε κάθε καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε επίσης για την επιβεβαίωση του μήκους της πρωτεΐνης που παράγεται. Συγκεκριμένα, η BR2-GFP εκφράστηκε σε κάθε περίπτωση με ένα επίτοπο FLAG (FLAG tag) στο N-τελικό της άκρο και ένα επίτοπο έξι ιστιδινών (6 His tag) στο C-τελικό της άκρο μετά το GFP (**Εικόνα 12**). Το γεγονός αυτό επιτρέπει την ανίχνευσή της με τη χρήση τριών αντισωμάτων (αντί-His, αντί-FLAG και αντί-GFP). Στα αποτελέσματα που προήλθαν από τις τρεις αναλύσεις ανιχνεύεται σε κάθε περίπτωση μια ζώνη ίδιου μοριακού βάρους το οποίο είναι κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της μεμβρανοπρωτεϊνικής χίμαιρας BR2-GFP. Σημειώνεται πως είναι εξαιρετικά σύνηθες οι μεμβρανικές πρωτεΐνες να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και οι ζώνες που ανιχνεύονται τελικά να αντιστοιχούν περίπου στο 65-75 % του πραγματικού μοριακού τους βάρους, λόγω της μεγάλης υδροφοβικότητάς τους και της πρόσδεσής τους σε μεγάλο αριθμό μορίων SDS (Madhavan et al., 2010). Η ανίχνευση λοιπόν μιας ζώνης ίδιου μοριακού μεγέθους από τα τρία αντισώματα που υβριδίζουν και στα δύο άκρα της πρωτεΐνης, υποδεικνύει την ακεραιότητα των δύο άκρων της πρωτεΐνης και συνεπώς την παραγωγή πλήρους μήκους ανασυνδυασμένης BR2-GFP (**Εικόνα 20 Γ, Δ**).

Προκειμένου να μελετηθεί επιπλέον η ποιότητα της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης που υπερ-παράγεται με ταυτόχρονη συνέκφραση της RraA πρωτεΐνης που φαίνεται να είναι η πιο αποτελεσματική ως προς την ενίσχυση της παραγωγικότητας, δηλαδή της RraA από τον οργανισμό *P. mirabilis*, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), σε συνδυασμό με μέτρηση του ενδοπηκτικού φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά western. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ανίχνευση του ενδοπηκτικού φθορισμού μεμβρανικών πρωτεϊνών που

εκφράζονται στο βακτήριο ως ένωση με την GFP και έχουν αναλυθεί σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες (χωρίς προηγούμενο βρασμό των δειγμάτων), σε συνδυασμό με ανοσοαποτύπωση κατά western, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο διερεύνησης του ποσοστού της παραγόμενης μεμβρανοπρωτεΐνη το οποίο βρίσκεται σε σωστά αναδιπλωμένη μορφή και έχει εισαχθεί επιτυχώς στην κυτταρική μεμβράνη (Geertsma et al., 2008). Συγκεκριμένα, η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση τέτοιων χημικών πρωτεϊνικών δειγμάτων οδηγεί στην εμφάνιση δύο ζωνών, οι οποίες δημιουργούνται από πλήρους μήκους μεμβρανοπρωτεΐνες. Η ζώνη με τη μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική ικανότητα, η οποία εμφανίζεται πιο χαμηλά στην πηκτή αντιστοιχεί στην σωστά αναδιπλωμένη και φθορίζουσα πρωτεΐνη, ενώ η ζώνη που διατρέχει πιο αργά την πηκτή αντιστοιχεί σε πρωτεΐνη με λάθος αναδίπλωση που δε φθορίζει. Και οι δύο ζώνες ανιχνεύονται επίσης με χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά western. Κατά τον βρασμό των δειγμάτων, το σύνολο της παραγόμενης πρωτεΐνης εμφανίζει την ίδια ηλεκτροφορητική ικανότητα, διατρέχει την πηκτή με την ίδια ταχύτητα και εντοπίζεται σε μια ζώνη που δε φθορίζει, αλλά ανιχνεύεται με το κατάλληλο αντίσωμα με χρήση ανοσοαποτύπωσης κατά western. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αναλύθηκαν δείγματα από το ολικό κλάσμα απομονωμένων μεμβρανών τα οποία προέρχονταν από ίσο όγκο καλλιεργειών που εξέφραζαν τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση των *rraA* γονιδίων από τους οργανισμούς *E. coli* και *P. mirabilis*. Σύμφωνα με την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, αποδεικνύεται ότι η συμπαραγωγή της RraA από τον οργανισμό *P. mirabilis* δεν οδηγεί μόνο σε αυξημένη συσσώρευση ολικής μεμβρανικής πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά επιπλέον προωθεί την παραγωγή σημαντικά αυξημένων επιπέδων σωστά αναδιπλωμένης μεμβρανοπρωτεΐνης (**Εικόνα 20, Δ**). Για την περεταίρω μελέτη της κατάστασης της πρωτεΐνης που παράγεται πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με ανίχνευση του φθορισμού των κλασμάτων που παράγονται (fluorescence-detection size-exclusion chromatography, FSEC) (Kawate and Gouaux, 2006). Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσφέρει επιπλέον πληροφορίες για το μέγεθος της

μεμβρανικής πρωτεΐνης που παράγεται σύμφωνα με τον όγκο στον οποίο εκλούεται, τους διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού των πρωτεϊνικών μορίων της σύμφωνα με τις διαφορετικές κορυφές που σχηματίζονται στο χρωματογράφημα, καθώς και για την αναδίπλωση των μορίων σύμφωνα με την ποιότητα και το εύρος των σχηματιζόμενων κορυφών. Το χρωματογράφημα που προέκυψε από τον ανιχνευτή φθορισμού κατά την ανάλυση της μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP που παράγεται σε βακτηριακά κύτταρα με ταυτόχρονη συνέκφραση της RraA του οργανισμού *P. mirabilis*, έδειξε ότι η ανασυνδυασμένη BR2 που υπερπαράγεται, έχει – εν πολλοίς – καλή αναδίπλωση, ειδικά αναλογιζόμενοι τη μεγάλη δυσκολία παραγωγής μιας τέτοιας πρωτεΐνης-στόχου, όπως η BR2 στο βακτήριο (Link et al., 2008). Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η BR2 εκλούεται σε μια διπλή κορυφή στα 70-85 mL (βέλη 2 και 4) η οποία ενδεχομένως αποτελείται από μονομερή και διμερή της πρωτεΐνης, ενώ επιπλέον ανιχνεύεται φθορισμός από πρωτεΐνη χαμηλότερου μοριακού βάρους (βέλος 6), ο οποίος πιθανότατα αντιστοιχεί σε ελεύθερη GFP πρωτεΐνη (**Εικόνα 21, Α**). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια μέσω ανίχνευσης ενδοπηκτικού φθορισμού των κλασμάτων που αναλύθηκαν με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου που δε περιείχε κανέναν αποδιατακτικό παράγοντα (native-PAGE) (**Εικόνα 21, πάνω**) και μέσω SDS-PAGE σε συνδυασμό με ανοσοαποτύπωση των ίδιων κλασμάτων (**Εικόνα 21, κάτω**).



**Εικόνα 21:** Ανάλυση της μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP που παράγεται κατά τη συνέκφραση της PmRraA με ανίχνευση φθορισμού σε κλάσματα από χρωματογραφία μοριακής διήθησης. (A) Χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δειγμάτων απομονωμένων μεμβρανών από κύτταρα που εκφράζουν τη μεμβρανική χίμαιρα BR2-GFP με

ταυτόχρονη συνέκφραση της RraA πρωτεΐνης από τον οργανισμό *P. mirabilis*. Η βαθμονόμηση της στήλης σημειώνεται στο πάνω μέρος του χρωματογραφήματος. Τα βέλη υποδεικνύουν τα κλάσματα που επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν περαιτέρω. (B) (πάνω) Ανάλυση των κλασμάτων που επιλέχθηκαν με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (native-PAGE) και (κάτω) ανάλυση των ίδιων κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε αποδιατακτικές συνθήκες και ανοσοαποτύπωση κατά western χρησιμοποιώντας αντί-GFP αντίσωμα μετά από κατακρήμνιση με χρήση τριχλωροξικού οξέος (trichloroacetic acid).

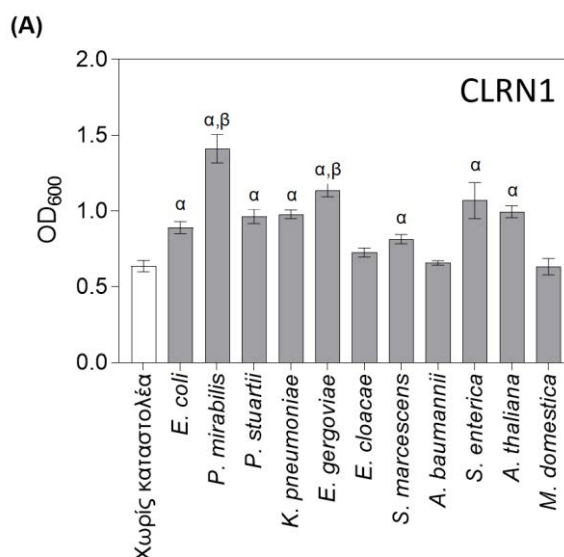
Στη συνέχεια, μελετήθηκε το κατά πόσο οι ευεργετικές ιδιότητες των διαφορετικών ομόλογων *rraA* γονιδίων που ανιχνεύθηκαν κατά τη συνέκφρασή τους με την BR2-GFP εξειδικεύονται μόνο σε αυτή την περίπτωση ή μπορούν να παρουσιαστούν και κατά τη συνέκφραση με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Έτσι, αξιολογήθηκε η επίδραση της συνέκφρασης του συνόλου των ομόλογων *rraA* γονιδίων στην τελική πυκνότητα αλλά και στον φθορισμό ίσου όγκου καλλιιεργειών που παράγουν έξι επιπλέον ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν είχαν διαφορετικά χαρακτηριστικά όπως μέγεθος, αριθμό διαμεμβρανικών ελίκων, τοπολογία και βιοχημικές ιδιότητες ενώ προέρχονταν επίσης τόσο από προκαρυωτικούς όσο και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν οι εξής πρωτεΐνες: (i) ο ανθρώπινος κεντρικός υποδοχέας κανναβινοειδών (central cannabinoid receptor, CB1), (ii) ο ανθρώπινος περιφερειακός υποδοχέας κανναβινοειδών (peripheral cannabinoid receptor, CB2), (iii) η ανθρώπινη μεμβρανοπρωτεΐνη clarin-1 που μοιάζει με τις τετρασπανίνες και εμπλέκεται στην ακοή και την όραση (CLRN1), (iii) μια αντλία ενεργητικής εκροής του οργανισμού *E. coli* (multidrug efflux transporter, MdfA), (iv) ένα υψηλής αγωγιμότητας κανάλι ιόντων του οργανισμού *Mycobacterium tuberculosis* (large conductance mechanosensitive channel, MscL), και (v) μια δέλτα-ροδοψίνη από τον οργανισμό *Haloterrigena turkmenica* (*Haloterrigena turkmenica* deltarhodopsin, HtdR) (Πίνακας 2).

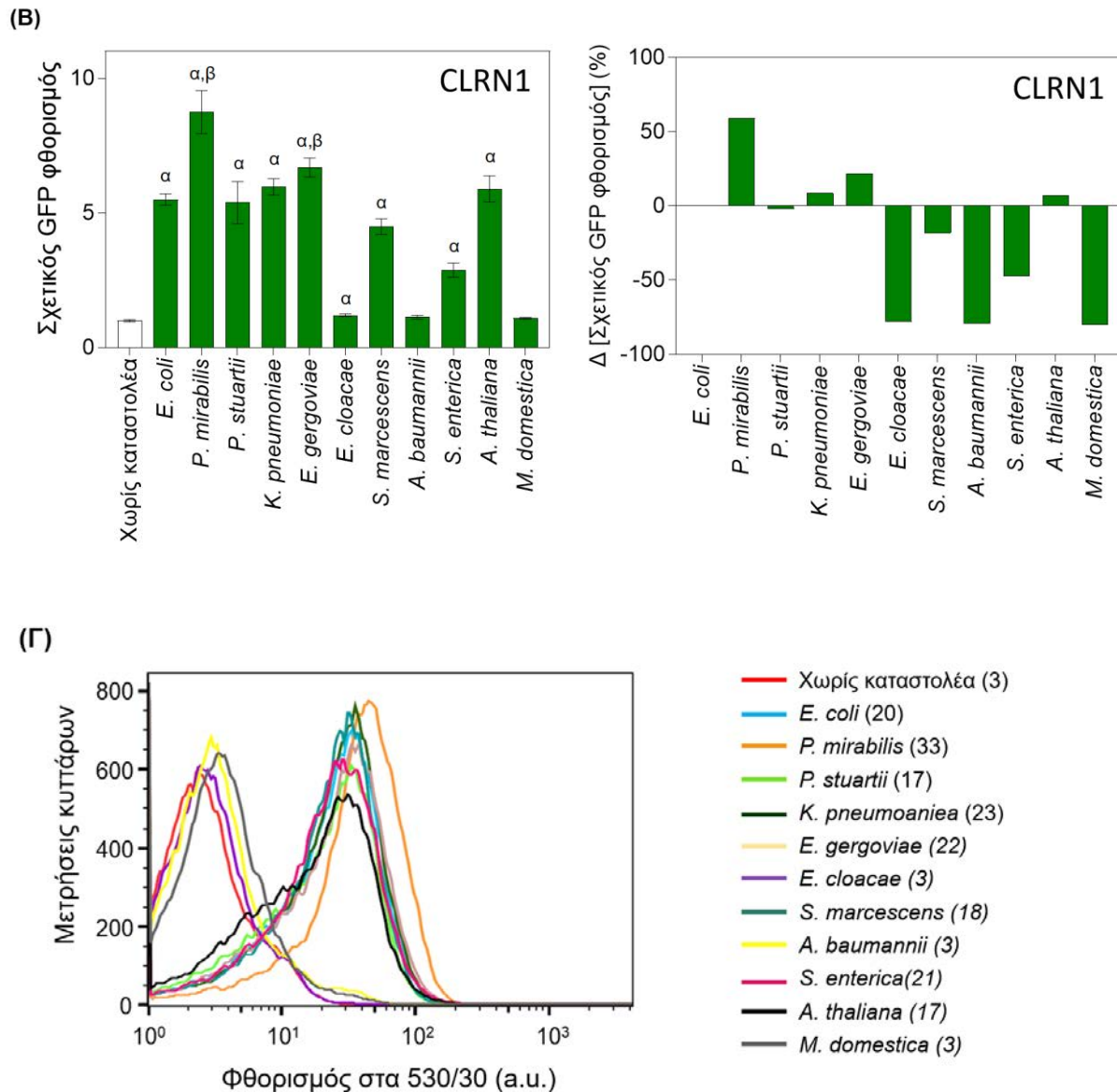
**Πίνακας 2: Μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών SuptoxR δεύτερης γενιάς.**

| Μεμβρανική πρωτεΐνη | Οργανισμός                        | Λειτουργία                                                                       | Αριθμός διαμεμβρανικών ελίκων | Τοπολογία                          | Μάζα (kDa) |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------|
| BR2                 | <i>Homo sapiens</i>               | Υποδοχέας της βραδυκινίνης 2 (GPCR)                                              | 7                             | N <sup>out</sup> - C <sup>in</sup> | 44.5       |
| CB1                 | <i>Homo sapiens</i>               | Κεντρικός υποδοχέας κανναβινοειδών (GPCR)                                        | 7                             | N <sup>out</sup> - C <sup>in</sup> | 52.9       |
| CB2                 | <i>Homo sapiens</i>               | Περιφερειακός υποδοχέας κανναβινοειδών (GPCR)                                    | 7                             | N <sup>out</sup> - C <sup>in</sup> | 39.7       |
| CLRN1               | <i>Homo sapiens</i>               | Clarin-1 – Μέλος της οικογένειας μεμβρανοπρωτεϊνών που μοιάζουν με τετρασπανίνες | 4                             | N <sup>in</sup> – C <sup>in</sup>  | 25.7       |
| MscL                | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Μεγάλο κανάλι υψηλής αγωγιμότητας                                                | 2                             | N <sup>in</sup> – C <sup>in</sup>  | 16.0       |
| MdfA                | <i>Escherichia coli</i>           | Αντλία ενεργητικής εκροής                                                        | 12                            | N <sup>in</sup> – C <sup>in</sup>  | 44.3       |
| HtdR                | <i>Haloterrigena turkmenica</i>   | Δέλτα-ροδοψίνη                                                                   | 7                             | N <sup>out</sup> - C <sup>in</sup> | 27.1       |

Η υπερέκφραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών CLRN1-GFP, CB1-GFP και CB2-GFP, χωρίς και με την συνέκφραση των *rraA* γονιδίων που επιλέχθηκαν, οδήγησε σε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν κατά την συμπαραγωγή των αντίστοιχων RraA πρωτεϊνών με την μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια των οποίων η υπερέκφραση

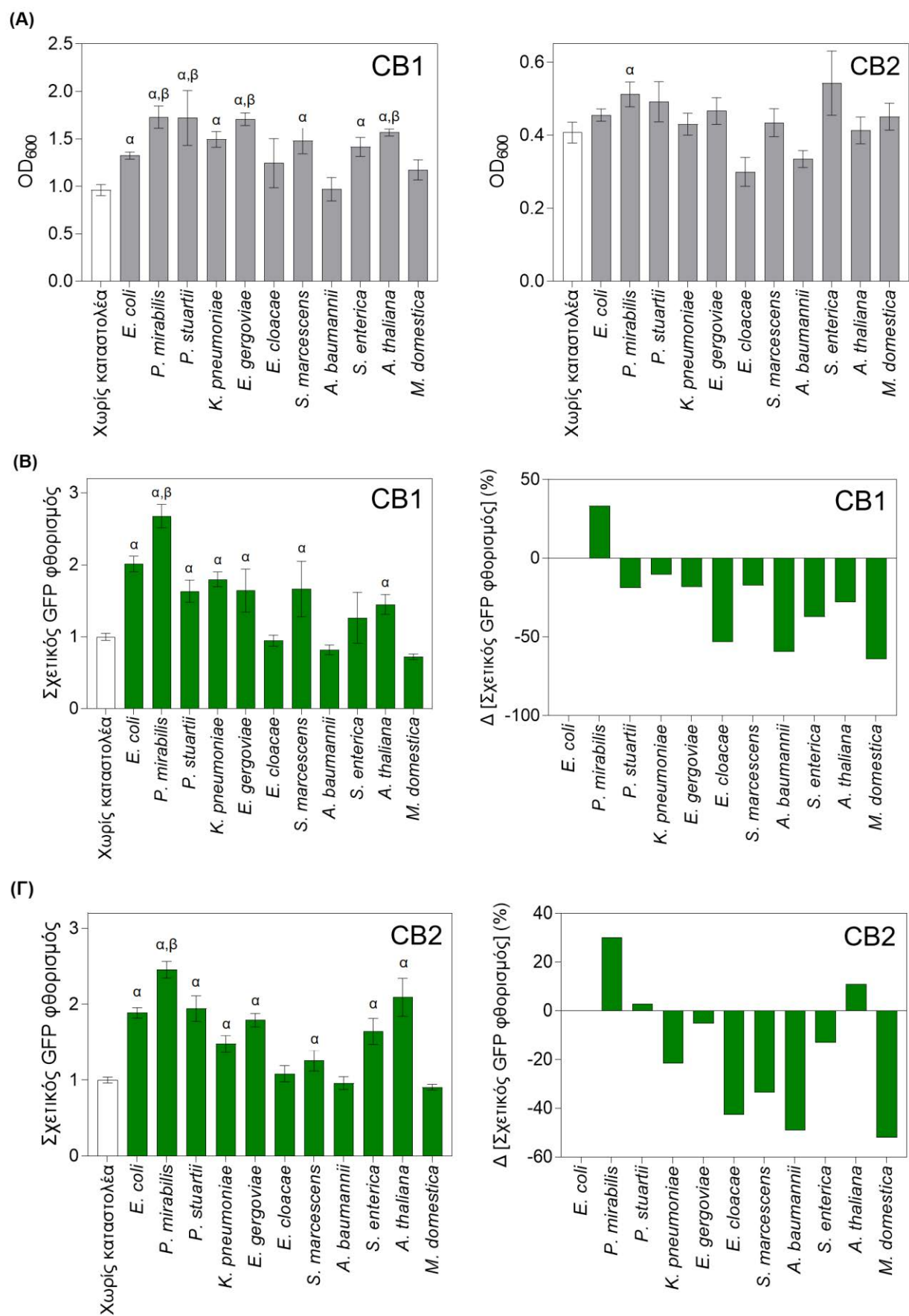
αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική στην καταστολή της τοξικότητας που επάγεται από την παραγωγή των ανασυνδυασμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών όπως αυτή υπολογίζεται μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm, αλλά και στην ενίσχυση του φθορισμού ο οποίος προέρχεται από ίσο όγκο καλλιέργειας υποδεικνύοντας αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης μεμβρανοπρωτεϊνών, ήταν και πάλι αυτά που προέρχονταν από τους οργανισμούς *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, και *Arabidopsis thaliana*. Μεταξύ αυτών, η RraA από τον οργανισμό *P. mirabilis* ήταν και πάλι η πιο αποτελεσματική από όλες όσες εξετάστηκαν, και μάλιστα ξεπέρασε σε απόδοση ξανά την RraA του *E. coli* που εκφράζεται στο στέλεχος SuptoxR. Οι καλλιέργειες που υπερέκφραζαν την PmRraA παρουσίασαν αύξηση της τελικής πυκνότητας των καλλιεργειών (10-60 % μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα στα 600 nm) και του φθορισμού (30-60 % υψηλότερος φθορισμός ίσου όγκου καλλιεργειών) που υποδεικνύουν καταπολέμηση της επαγόμενης τοξικότητας και αύξηση των επιπέδων συσσώρευσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών, αντίστοιχα (Εικόνα 22, Εικόνα 23).





**Εικόνα 22:** Η συνέκφραση ομόλογων RraA πρωτεϊνών βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης με τη μεμβρανοπρωτεΐνη CLRN1-GFP οδηγεί σε αύξηση της τελικής ανάπτυξης των καλλιεργειών καθώς και των επιπέδων συσσώρευσης της μεμβρανικής πρωτεΐνης στις κυτταρικές μεμβράνες. (Α) Τελική συγκέντρωση καλλιεργειών *E. coli* MC1061 κυττάρων που εκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη CLRN1-GFP χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συμπαραγωγή των διαφορετικών φυσικών RraA παραλλαγών, όπως υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm μετά το τέλος της διαδικασίας της υπερέκφρασης. (Β) (αριστερά) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου

βακτηριακών καλλιιεργειών MC1061 στα οποία έχει επαχθεί η παραγωγή της μεμβρανικής πρωτεΐνης CLRN1-GFP χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση των διαφορετικών ομόλογων *rraA* γονιδίων. (δεξιά) Ποσοστό αύξησης του σχετικού GFP φθορισμού που προέρχεται από την παραγόμενη πρωτεϊνική χίμαιρα CLRN1-GFP σε σύγκριση με τα επίπεδα φθορισμού της καλλιέργειας των SuptoxR κυττάρων (*E. coli*), όπως υπολογίζεται από τον τύπο  $\Delta[\text{Σχετικός GFP φθορισμός}] (\%) = [(GFP \text{ φθορισμός κατά τη συνέκφραση των διαφορετικών } rraA \text{ γονιδίων}) - (GFP \text{ φθορισμός κατά τη συνέκφραση του } rraA \text{ γονιδίου του } E. coli) / (GFP \text{ φθορισμός κατά τη συνέκφραση του } rraA \text{ γονιδίου του } E. coli)] \times 100$ . (Γ) Φθορισμός μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων MC1061 που υπερεκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεϊνική χίμαιρα CLRN1-GFP χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση του συνόλου των ομόλογων RraA πρωτεϊνών, όπως μετρήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Οι αριθμοί εντός των παρενθέσεων αντιστοιχούν στο μέσο όρο του φθορισμού των κυττάρων που προέρχονται από κάθε καλλιέργεια. Οι τιμές που αναγράφονται στα διαγράμματα στα (Α) και (Β) αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφαλμάτων αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m.. Το α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά του μέσου όρου της τιμής κάθε καλλιέργειας σε σχέση με το δείγμα «χωρίς καταστολέα» ( $p < 0.05$ ), ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα «*E. coli*» ( $p < 0.05$ ).



**Εικόνα 23: Η συνέκφραση ομόλογων RraA πρωτεϊνών βακτηριακής προέλευσης αυξάνει τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας και την παραγωγή των ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών CB1-GFP και CB2-GFP.** (Α) Τελική πυκνότητα καλλιιεργειών *E. coli* MC1061 κυττάρων που παράγουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη CB1-GFP (αριστερά) ή τη μεμβρανική πρωτεΐνη CB2-GFP (δεξιά), χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση του συνόλου των επιλεγμένων ομόλογων *rraA* γονιδίων βακτηριακής και φυτικής προέλευσης, όπως υπολογίζεται μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm μετά το πέρας της διαδικασίας της μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφρασης. (Β) (αριστερά) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου βακτηριακών καλλιιεργειών MC1061 κυττάρων που εκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεϊνική χίμαιρα CB1-GFP χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συμπαραγωγή του συνόλου των ομόλογων RraA πρωτεϊνών. (δεξιά) Ποσοστό αύξησης του σχετικού GFP φθορισμού που προέρχεται από την παραγόμενη πρωτεϊνική χίμαιρα CB1-GFP σε σύγκριση με τα επίπεδα φθορισμού της καλλιέργειας των SuptoxR κυττάρων (*E. coli*), όπως υπολογίζεται από τον τύπο  $\Delta[\text{Σχετικός GFP φθορισμός}] (\%) = [(GFP \text{ φθορισμός κατά τη συνέκφραση των διαφορετικών } rraA \text{ γονιδίων}) - (GFP \text{ φθορισμός κατά τη συνέκφραση του } rraA \text{ γονιδίου του } E. coli)] \times 100$ . (Γ) Διαγράμματα σχετικού φθορισμού και ποσοστού αύξησής του όπως στο (Β) για καλλιέργειες στις οποίες παράγεται η μεμβρανική πρωτεΐνη CB2-GFP. Οι τιμές που αναγράφονται στα διαγράμματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφαλμάτων αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m.. Το α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά του μέσου όρου της τιμής κάθε καλλιέργειας σε σχέση με το δείγμα «χωρίς καταστολέα» ( $p < 0.05$ ), ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα «*E. coli*» ( $p < 0.05$ ).

Μια επιπλέον μεμβρανική πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της πειραματικής διαδικασίας, ήταν μια δέλτα ροδοψίνη από τον οργανισμό *Haloterrigena turkmenica* (*Haloterrigena turkmenica* deltarhodopsin, HtdR). Η HtdR ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των ροδοψινών μέλη της οποίας απαντώνται τόσο σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς όσο και σε βακτήρια και αρχαία. Οι μικροβιακές ροδοψίνες (ή ροδοψίνες τύπου I) εκφράζονται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (βακτήρια, κυανοβακτήρια, αρχαία) καθώς και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (φύκη, μύκητες) και συμμετέχουν σε λειτουργίες απαραίτητες για τη βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς απορροφούν πρωτόνια τα οποία στη

συνέχεια χρησιμοποιούνται είτε για την παραγωγή ενέργειας, είτε για τη μεταγωγή σημάτων ενδοκυτταρικά ή διακυτταρικά (Spudich et al., 2000). Οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν αποκλειστικά μια διαφορετική κατηγορία ροδοψινών (ροδοψίνες τύπου II), οι οποίες ανήκουν σε μια εξειδικευμένη υποομάδα της οικογένειας των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCRs) και συμμετέχουν επίσης σε διεργασίες όπως η όραση ή η διατήρηση του κερκαδικού ρολογιού που ρυθμίζονται μέσω της απορρόφησης και μεταφοράς πρωτονίων από την έκθεση στο φως (Palczewski, 2006). Δομικά, τα μέλη που ανήκουν και στις δύο κατηγορίες ροδοψινών υιοθετούν την ίδια χαρακτηριστική στερεοδιαμόρφωση με επτά διαμεμβρανικές α-έλικες όπου το N-τελικό άκρο της μεμβρανοπρωτεΐνης βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο ενώ το C-τελικό της άκρο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Ernst et al., 2014). Παρόλα αυτά όμως, οι ροδοψίνες τύπου I και τύπου II διαφέρουν σημαντικά ως προς την αμινοξική ακολουθία, τον τρόπο που τοποθετούνται στο χώρο οι διαμεμβρανικές α-έλικες, το μέγεθος των βρόγχων που τις ενώνουν καθώς και το μήκος των ακολουθιών που εξέχουν από τη μεμβράνη στα δύο άκρα της πρωτεΐνης (de Grip and Ganapathy, 2022).

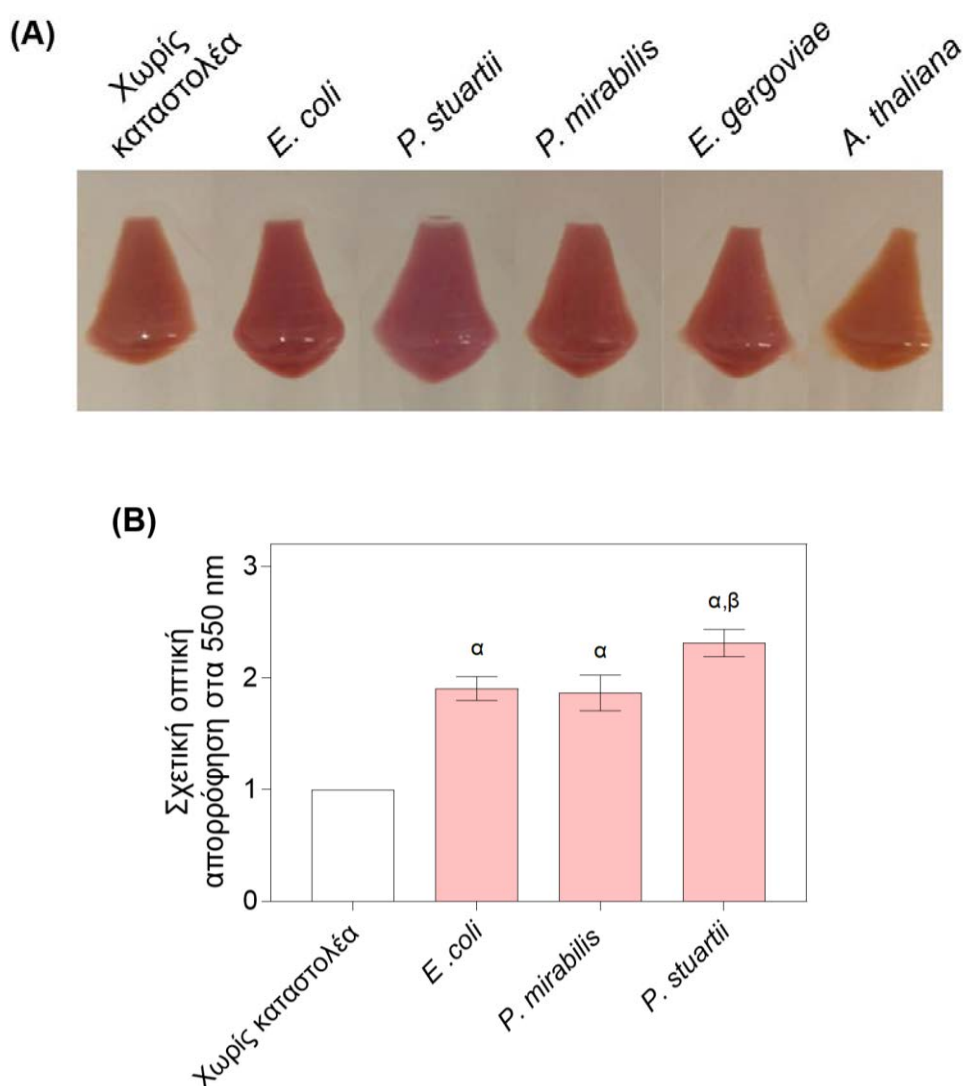
Η δομή των ροδοψινών ολοκληρώνεται με τη δέσμευση του χρωμοφόρου ρετινάλη, η οποία αποτελεί μια αλδεΐδη της βιταμίνης A που παράγεται στους οργανισμούς από το β-καροτένιο. Αν και τα διάφορα μέλη της οικογένειας έχουν διαφορετική δομή, σε όλες τις ροδοψίνες προσδένεται ομοιοπολικά το ίδιο χρωμοφόρο, και το σημείο πρόσδεσης είναι ένα αμινοξικό κατάλοιπο λυσίνης που βρίσκεται στην έβδομη διαμεμβρανική έλικα της μεμβρανοπρωτεΐνης, μέσω μιας βάσης Schiff. Στις βακτηριακές ροδοψίνες, κατά την έκθεση στο φως, δεσμεύονται πρωτόνια από τη ρετινάλη, γεγονός που οδηγεί σε ισομερισμό του χρωμοφόρου από *all-trans*-ρετινάλη σε *13-cis*-ρετινάλη, ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη. Η μετατροπή αυτή οδηγεί σε μετατόπιση του μήκους κύματος απορρόφησης των πρωτεϊνών, σε κάποιο σημείο που βρίσκεται στο φάσμα του ορατού φωτός (400-700 nm), προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο χρώμα στην πρωτεΐνη. Αν και το χρωμοφόρο που προσδένεται σε όλες τις ροδοψίνες είναι το ίδιο, η

ρετινάλη, η κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετικό μέγιστο απορρόφησης όταν βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση, συνεπώς διαφορετικό χρώμα (Ernst et al., 2014).

Η HtdR λειτουργεί ως μια φωτοεπαγόμενη αντλία πρωτονίων με την ιδιότητα, όταν είναι σωστά αναδιπλωμένη, να προσδένει το χρωμοφόρο *all-trans*-ρετινάλη και να αποκτά ένα χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα, το οποίο έχει μέγιστο απορρόφησης στα 550 nm (Kamo et al., 2006). Οι μικροβιακές ροδοψίνες, όπως η HtdR, έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία, ιδιαίτερα σε μελέτες οπτικής ηλεκτροφυσιολογίας (Hochbaum et al., 2014). Επιπλέον, η ανίχνευση των επιπέδων παραγωγής του χαρακτηριστικού αυτού ιώδους χρωματισμού τους, αποτελεί μια πολύ καλή ένδειξη της λειτουργικότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης (Nannenga and Baneyx, 2011a; Ernst et al., 2014; Michou et al., 2019; Michou et al., 2020a).

Καθώς η HtdR αποτελεί μια ροδοψίνη η οποία στο παρελθόν έχει εκφραστεί επιτυχώς στο *E. coli* (Kamo et al., 2006) και του γεγονότος ότι μπορεί εύκολα μέσω του χαρακτηριστικού της χρώματος να διερευνηθούν τα επίπεδα παραγωγής λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε ως μια ακόμη μεμβρανική πρωτεΐνη-στόχος στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Η ροδοψίνη συνεκφράστηκε με ένα υποσύνολο ομόλογων RraA πρωτεϊνών, οι οποίες επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη με βάση τα αποτελέσματά των προηγούμενων πειραμάτων. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν να συνεκφραστούν τα *rraA* γονίδια από τους οργανισμούς *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *E. gergoviae* και *A. thaliana*, καθώς βρέθηκε ότι οι ομόλογες RraA πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται σε αυτές τις περιπτώσεις, βοηθούν στην προώθηση της παραγωγικότητας των τεσσάρων μεμβρανικών πρωτεϊνών που είχαν ήδη μελετηθεί (BR2-GFP, CB1-GFP, CB2-GFP, CLRN1-GFP). Η υπερέκφραση της HtdR πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες σκότους, και στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε επιπλέον το χρωμοφόρο ρετινάλη. Όπως φαίνεται από το χρώμα του βακτηριακού πληθυσμού που κατακρημνίστηκε με φυγοκέντρηση μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης (**Εικόνα 24, Α**), εκτός από την RraA του οργανισμού *A. thaliana*, όλες οι υπόλοιπες RraA πρωτεΐνες που

μελετήθηκαν ήταν αποτελεσματικές στην προώθηση των επιπέδων συσσώρευσης ολικής μεμβρανικής πρωτεΐνης που βρίσκεται σε σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική μορφή, σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασής της κατά τη συμπαραγωγή της RraA του *E. coli*. Μεταξύ αυτών, η RraA από τον οργανισμό *P. stuartii* ήταν η πιο αποτελεσματική και η συνέκφρασή της αύξησε την παραγωγικότητα ανασυνδυασμένης HtdR σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την EcRraA των SuptoxR κυττάρων, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 24, Β** όπου μετρήθηκε η απορρόφηση συνολικής απομονωμένης HtdR που προέρχεται από ίσο όγκο καλλιιεργειών και εξήχθη με χρήση της επιφανειοενεργής ουσίας n-Dodecyl β-D-maltoside (DDM).

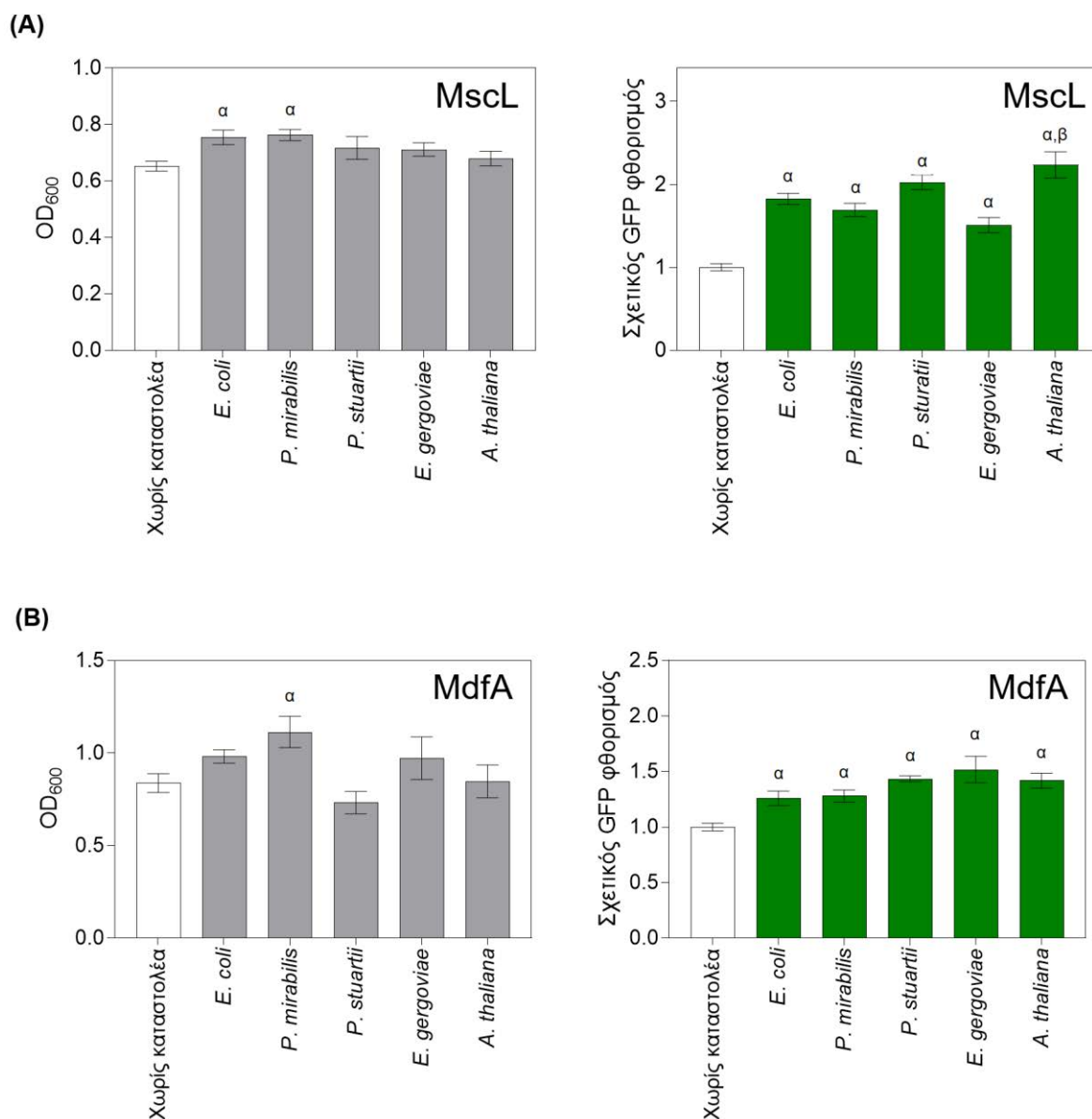


**Εικόνα 24: Η συνέκφραση συγκεκριμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών προωθεί τα επίπεδα συσσώρευσης σωστά αναδιπλωμένης και λειτουργικής HtdR. (A) Έγχρωμος**

κατακρημνισμένος βακτηριακός πληθυσμός που προέκυψε από φυγοκέντρηση ίσου όγκου καλλιεργειών *E. coli* κυττάρων MC1061 που παράγουν τη ροδοψίνη HtdR παρουσία 10  $\mu$ M all-*trans*-ρετινάλης χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση ομόλογων *rraA* γονιδίων. (B) Σχετική οπτική απορρόφηση στα 550 nm (OD<sub>550</sub>) της ροδοψίνης HtdR η οποία εξήχθη με χρήση της επιφανειοενεργής ουσίας DDM, από τις μεμβράνες επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών από αυτούς που παρουσιάζονται στο (A) μετά από κυτταρική λύση. Το χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα υποδεικνύει ότι η μεμβρανοπρωτεΐνη που παράγεται βρίσκεται σε σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική μορφή. Οι αναγραφόμενες τιμές στο (A) αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m., το  $\alpha$  υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με το δείγμα «χωρίς καταστολέα», ενώ το  $\beta$  υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα «*E. coli*».

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης των ίδιων ομόλογων *rraA* γονιδίων, που αναφέρθηκαν προηγουμένως και επιλέχθηκαν ως οι πιο αποτελεσματικοί συμπαράγοντες καταστολής της κυτταροτοξικότητας και προώθησης της παραγωγικότητας των μεμβρανικών πρωτεϊνών, στην παραγωγή δύο επιπλέον μεμβρανοπρωτεϊνών προκαρυωτικής προέλευσης που εκφράζονται ως ένωση με την GFP, της MscL-GFP και της MdfA-GFP. Όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 25**, παρατηρήθηκε και σε αυτές τις περιπτώσεις πως κατά τη συμπαραγωγή και των πέντε επιλεγμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών αυξήθηκε ο φθορισμός των καλλιεργειών σε σχέση με την καλλιέργεια στην οποία δεν παράγεται καμία RraA, γεγονός που υποδεικνύει τη συσσώρευση μεγαλύτερων ποσοτήτων των δύο πρωτεϊνών. Στην περίπτωση που επάγεται η παραγωγή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης MdfA από τον οργανισμό *E. coli*, φαίνεται πως οι RraA πρωτεΐνες από τους οργανισμούς *E. gergoviae* και *P. stuartii* ήταν αυτές που ενίσχυσαν περισσότερο την παραγωγικότητά της, σύμφωνα με τις μετρήσεις του σχετικού GFP φθορισμού (**Εικόνα 25, B**), ενώ στις καλλιέργειες που παράγεται η διαμεμβρανική πρωτεΐνη MscL από τον οργανισμό *M. tuberculosis*, οι ομόλογες RraA πρωτεΐνες που έδρασαν ως πιο επιτυχημένοι ενισχυτές της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης ήταν εκείνες από τους οργανισμούς *A. thaliana* και *P. stuartii* (**Εικόνα 25, A**). Σημειώνεται σε αυτό το σημείο πως σε

προηγούμενη έρευνα μελετήθηκε η ποιότητα της MscL που εκφράζεται στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxR, και βρέθηκε ότι η παραγόμενη μεμβρανοπρωτεΐνη έχει σωστή αναδίπλωση και υιοθετεί μια συμμετρική διάταξη πενταμερούς σε κλειστή διαμόρφωση, η οποία συμφωνεί με την κρυσταλλική δομή του συγκεκριμένου καναλιού που έχει επιλυθεί και κατατεθεί στην Protein Data Bank (PDB 2OAR) (Michou et al., 2019).

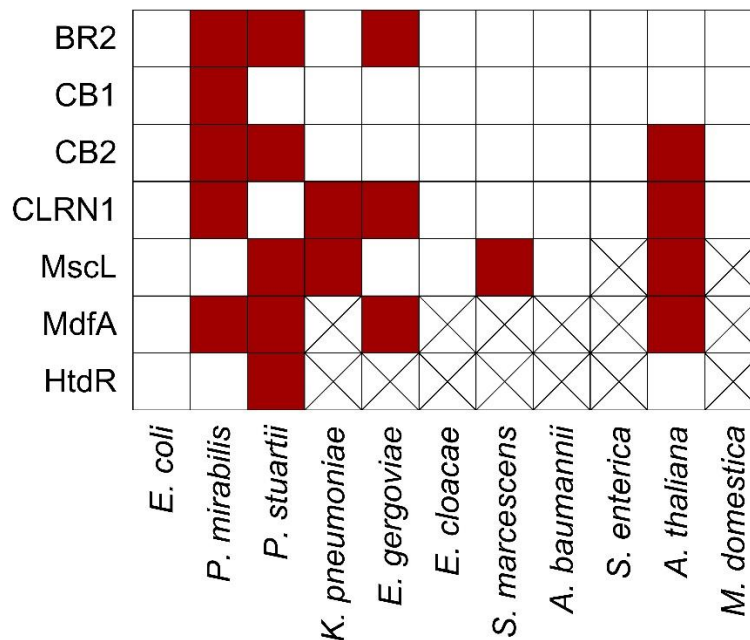


**Εικόνα 25:** Η έκφραση επιλεγμένων ομόλογων RraA πρωτεϊνών ενισχύει την παραγωγικότητα των βακτηριακών κυττάρων που συνεκφράζουν τις ανασυνδυασμένες μεμβρανοπρωτεΐνες MscL-GFP και MdfA-GFP. (A) (αριστερά) Επίδραση της υπερέκφρασης των επιλεγμένων ομόλογων *rraA* γονιδίων στην ανάπτυξη *E. coli* MC1061

κυττάρων που υπερπαράγουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη MscL-GFP από τον οργανισμό *M. tuberculosis*. OD<sub>600</sub>: οπτική πυκνότητα στα 600 nm. (δεξιά) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου βακτηριακών καλλιέργειών MC1061 κυττάρων που παράγουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη MscL-GFP χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με την ταυτόχρονη συνέκφραση των πέντε επιλεγμένων ομόλογων *rraA* γονιδίων. (B) (αριστερά) Όμοια με το (A, αριστερά) για τη μεμβρανοπρωτεΐνη MdfA-GFP του οργανισμού *E. coli*. (δεξιά) Όμοια με το (A, δεξιά) για τη μεμβρανοπρωτεΐνη MdfA-GFP. Οι τιμές που αναφέρονται σε όλα τα διαγράμματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφαλμάτων αντιστοιχούν σε  $\pm$ s.e.m., το α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με το δείγμα «χωρίς καταστολέα», ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα «*E. coli*».

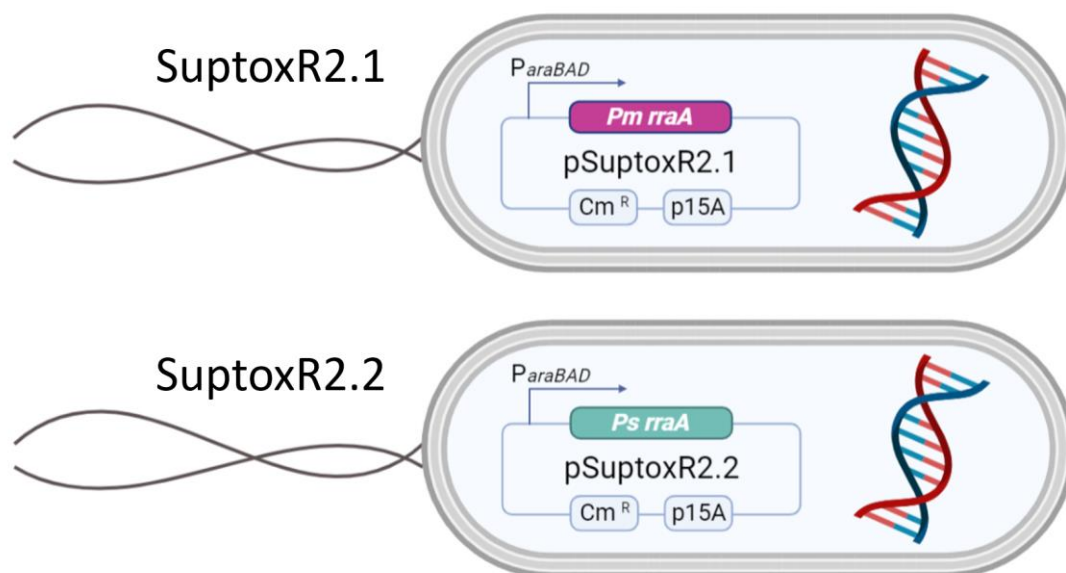
### 2.3. Κατασκευή των βελτιωμένων *E. coli* στελεχών δεύτερης γενιάς SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2

Από το σύνολο των ομόλογων RraA πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την τοξικότητα που προκαλεί συχνά η βακτηριακή υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και να ενισχύουν την παραγωγικότητα ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνέκφρασής τους με τις επτά διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που δοκιμάστηκαν, προκύπτει ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, οι RraA πρωτεΐνες από τους οργανισμούς *P. mirabilis* και *P. stuartii* ήταν αυτές που αποδείχθηκαν οι πιο αποτελεσματικές, και μάλιστα είχαν βελτιωμένη απόδοση σε σύγκριση με την RraA του *E. coli* που εκφράζεται στο αρχικό στέλεχος SuptoxR (Εικόνα 26).



**Εικόνα 26:** Συνοπτικό διάγραμμα που παρουσιάζεται η επίδραση της συνέκφρασης του συνόλου των ομόλογων *rraA* γονιδίων στην παραγωγικότητα ανά μονάδα όγκου καλλιέργειών στις οποίες εκφράζεται κάθε μια από τις επτά διαφορετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, σε σύγκριση με τα επίπεδα παραγωγής στα SuptoxR κύτταρα που συνεκφράζουν το γονίδιο *rraA* του *E. coli*. Με κόκκινο σημειώνονται τα τετράγωνα στα οποία παρατηρείται αύξηση της παραγωγικότητας ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας σε σύγκριση με το αρχικό στέλεχος SuptoxR, με λευκό σημειώνονται τα τετράγωνα στα οποία είτε δεν παρατηρείται κάποια επίδραση είτε η παραγωγικότητα είναι μειωμένη συγκριτικά με το SuptoxR, ενώ με x σημειώνονται οι συνδυασμοί οι οποίοι δε μελετήθηκαν.

Με βάση αυτά τα δεδομένα, κατασκευάστηκαν δύο νέα βακτηριακά στελέχη SuptoxR δεύτερης γενιάς, τα οποία ονομάστηκαν SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2. Τα στελέχη αυτά υπερεκφράζουν τις RraA πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονιδιώματα των οργανισμών *P. mirabilis* (PmRraA) και *P. stuartii* (PsRraA), αντίστοιχα, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *araBAD* και του μορίου-επαγωγέα L(+)-αραβινόζη (Εικόνα 27, Εικόνα 29).



**Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση των *E. coli* στελεχών SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2.** Τα βακτηριακά στελέχη SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 φέρουν από ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί για το *rraA* γονίδιο από τον οργανισμό *P. mirabilis* και *P. stuartii* αντίστοιχα. Και στα δύο πλασμίδια η επαγωγή της έκφρασης του εκάστοτε *rraA* γονιδίου πραγματοποιείται με προσθήκη του μορίου-επαγωγέα L(+)-αραβινόζη καθώς η έκφρασή τους έχει τεθεί υπό τον έλεγχο του υποκινητή *araBAD*.

Το ποιο από τα δύο νέα βακτηριακά στελέχη δεύτερης γενιάς (SuptoxR2.X ) είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται πλήρως από την εκάστοτε πρωτεΐνη-στόχο που παράγεται. Σε όλες τις περιπτώσεις ανθρώπινων μεμβρανικών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, η συμπαραγωγή της RraA του οργανισμού *P. mirabilis* ήταν πιο αποτελεσματική στην προώθηση της παραγωγικότητάς τους, ενώ στην περίπτωση της παραγωγής μεμβρανοπρωτεϊνών προκαρυωτικής προέλευσης, η RraA από τον οργανισμό *P. stuartii* ήταν αυτή που προκάλεσε τη μεγαλύτερη ή μια από τις μεγαλύτερες αυξήσεις στην παραγωγικότητα τους. Οι δύο ομόλογες RraA πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν, οι PmRraA και PsRraA δεν αποτελούν κατ' ανάγκη τους βέλτιστους συμπαραγόντες που ενισχύουν με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο την παραγωγικότητα όλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών, και ενδεχομένως υπάρχουν και άλλες φυσικές παραλλαγές που κωδικοποιούνται στα γονιδιώματα

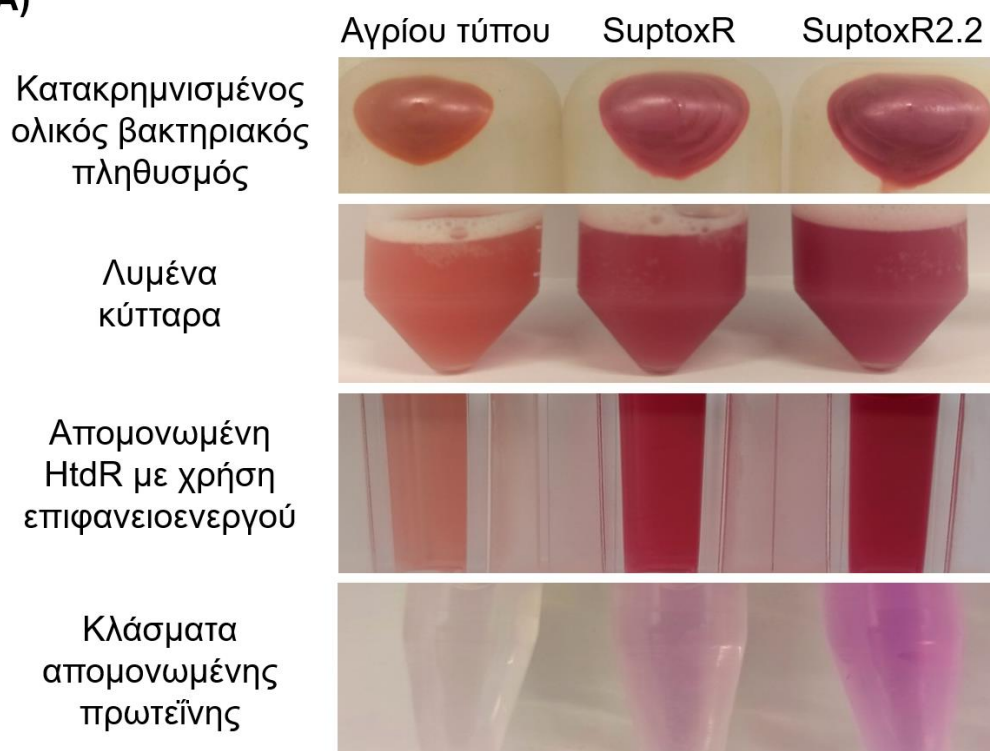
οργανισμών που δε μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας, οι οποίες θα μπορούσαν να λειτουργούν πιο ευεργετικά από την αρχική RraA του *E. coli* στην ενίσχυση των επιπέδων συσσώρευσης άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Προκειμένου να μελετηθεί η απόδοση παραγωγής απομονωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, που μπορεί να επιτευχθεί στα βακτηριακά στελέχη SuptoxR δεύτερης γενιάς που κατασκευάστηκαν, επιλέχθηκε να υπερεκφραστεί και να απομονωθεί η ροδοψίνη HtdR. Συγκεκριμένα η HtdR παράχθηκε με έναν επίτοπο έξι ιστιδινών (6 His tag) σε βακτηριακά κύτταρα αγρίου τύπου, σε SuptoxR καθώς και σε SuptoxR2.2. Η παραγωγή της ροδοψίνης στα SuptoxR2.2 κύτταρα, οδήγησε σε καλλιέργειες με ιδιαίτερα αυξημένη τελική πυκνότητα όπως φαίνεται από το μέγεθος του ιζήματος που συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρωση της καλλιέργειας (**Εικόνα 28, Α**), και σε ενισχυμένη παραγωγή ολικής πρωτεΐνης που φαίνεται από τον χρωματισμό του ιζήματος και του διαλύματος λυμένων κυττάρων από κάθε καλλιέργεια, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στην ποσότητα HtdR που εξήχθη από τις μεμβράνες των κυττάρων στη συνέχεια με χρήση επιφανειοενεργής ουσίας (**Εικόνα 28, Α**). Η HtdR που υπερεκφράστηκε με εφαρμογή πανομοιότυπων συνθηκών, σε κύτταρα αγρίου τύπου καθώς και στα στελέχη SuptoxR και SuptoxR2.2, εξήχθη από τα ολικά μεμβρανικά κλάσματα και διαλυτοποιήθηκε με χρήση της ουσίας DDM, ενώ στη συνέχεια απομονώθηκε με δύο διαδοχικές μεθόδους καθαρισμού και συγκεκριμένα με χρωματογραφία συγγένειας (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) η οποία ακολουθήθηκε από χρωματογραφία μοριακής διήθησης (size-exclusion chromatography, SEC) (**Εικόνα 28, Γ**). Η απόδοση παραγωγής ανασυνδυασμένης HtdR στο στέλεχος SuptoxR2.2, αυξήθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο από 400 % σε σύγκριση με την παραγωγικότητα στα αγρίου τύπου *E. coli*, και σε ποσοστό μεγαλύτερο από 100 % σε σύγκριση με τα επίπεδα παραγωγικότητάς της στο αρχικό SuptoxR στέλεχος. Μετά από υπολογισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που απομονώθηκε από τα SuptoxR στελέχη πρώτης και δεύτερης γενιάς, βρέθηκε ότι η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε περίπου 2 mg καθαρής

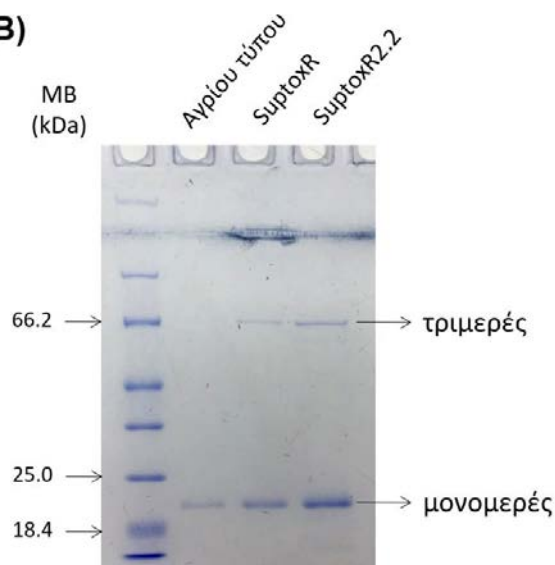
πρωτεΐνης ανά λίτρο υγρής καλλιέργειας στην περίπτωση που η υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε στα SuptoxR κύτταρα και σε 5 mg/L καθαρής πρωτεΐνης κατά την υπερέκφραση στα SuptoxR2.2. Σύμφωνα με την περαιτέρω ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση κατά western, των κλασμάτων της SEC που προήλθαν από τις κορυφές που εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας, και αντιστοιχούσαν στην απομονωμένη HtdR, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη κυρίως μιας ζώνης που εμφανίζει ηλεκτροφορητική ικανότητα παρόμοια με αυτή της ζώνης του μάρτυρα που αντιστοιχεί στα 19 kDa. Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στο μονομερές της πρωτεΐνης, καθώς όπως αναφέρθηκε είναι ιδιαίτερα σύνηθες οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί με χρήση επιφανειοενεργής ουσίας να διατρέχουν την πηκτή με μεγαλύτερη ταχύτητα από την αναμενόμενη σύμφωνα με τη μοριακή τους μάζα (Link et al., 2008; Madhavan et al., 2010) (**Εικόνα 28, Β, Δ**). Για κάθε κλάσμα απομονωμένης πρωτεΐνης που προήλθε από τα τρία διαφορετικά στελέχη, εμφανίζονται επιπλέον δύο ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους και σημαντικά μικρότερης έντασης. Η πρώτη εμφανίζεται στην εικόνα από την ανοσοαποτύπωση και αντιστοιχεί στη διμερή μορφή της πρωτεΐνης, ενώ η δεύτερη και στις δύο εικόνες που προέρχονται από τις δύο αναλύσεις και αντιστοιχεί στην τριμερή της μορφή. Ο σχηματισμός τριμερούς έχει παρατηρηθεί κατά την απομόνωση και άλλων ροδοψινών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της επίτευξης κρυσταλλικής δομής της βακτηριακής ροδοψίνης από τον οργανισμό *Halobacterium salinarum* που έχει κατατεθεί στην PDB (PDB 1DZE). Ταυτόχρονα όμως, η απομονωμένη πρωτεΐνη HtdR είχε το χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα που υποδεικνύει ότι και μετά τις σειριακές διαδικασίες απομόνωσής της βρισκόταν σε σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική μορφή (**Εικόνα 28, ΑΒ**). Συνδυαστικά λοιπόν, το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα νέα βακτηριακά στελέχη SuptoxR δεύτερης γενιάς που κατασκευάστηκαν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών καλής ποιότητας, οι

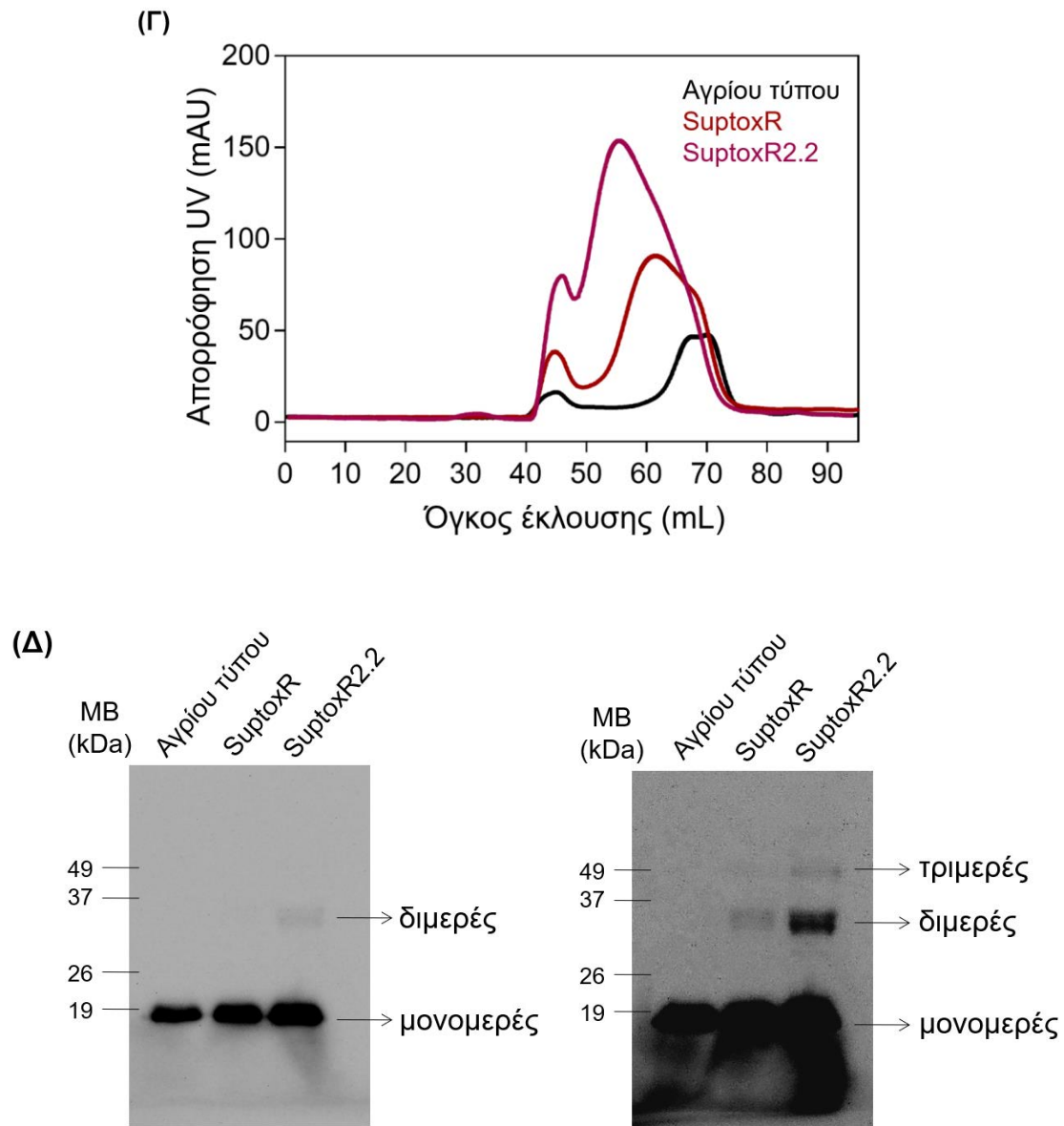
οποίες είναι κατάλληλες για περαιτέρω μελέτες που αφορούν τον δομικό και βιοχημικό χαρακτηρισμό τους.

**(A)**



**(B)**



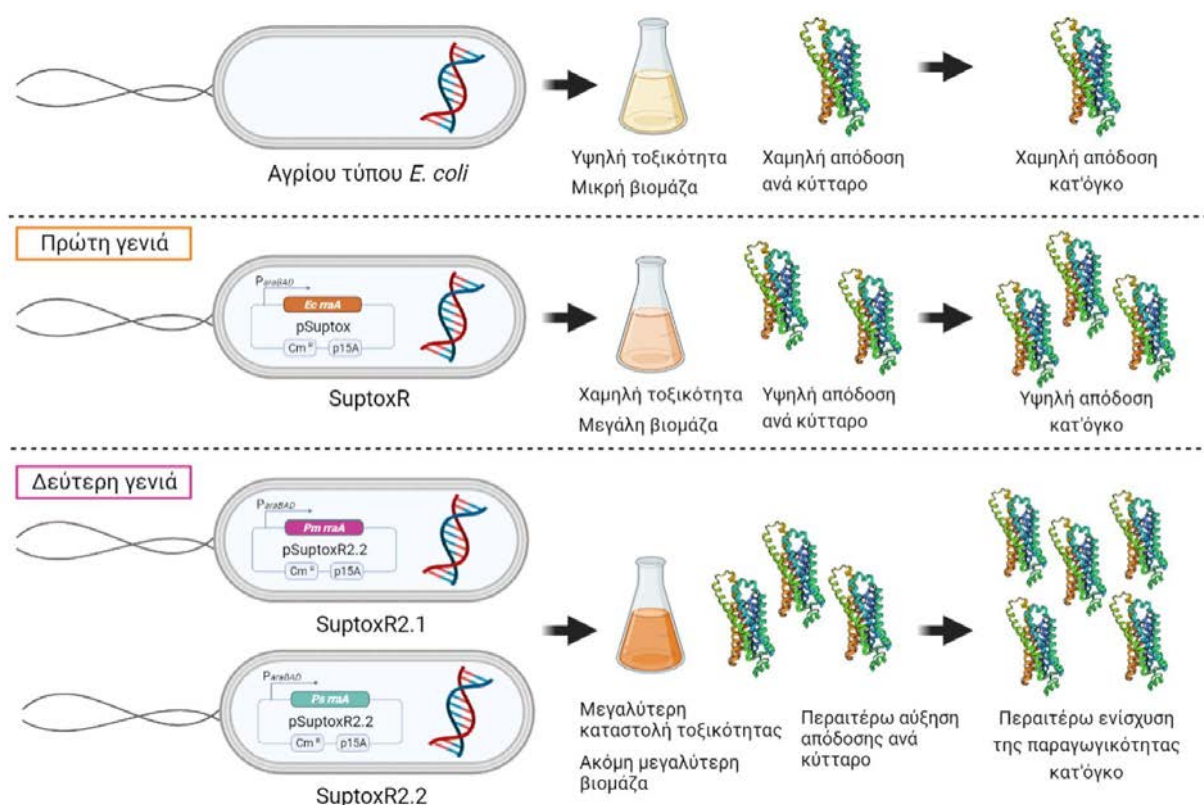


**Εικόνα 28: Τα βακτηριακά κύτταρα SuptoxR δεύτερης γενιάς παράγουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα απομονωμένης λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης. (Α)** Φωτογραφίες κατακρημνισμένου βακτηριακού πληθυσμού, λυμένων κυττάρων, HtdR που έχει εξαχθεί από τη μεμβράνη με χρήση DDM καθώς και απομονωμένης HtdR με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας *E. coli* MC1061, SuptoxR και SuptoxR2.2 κυττάρων που παράγουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη παρουσία 10  $\mu$ M *all-trans*-ρετινάλης. Σε κάθε στάδιο φαίνεται το έντονο χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα που αποκτά η σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική HtdR. (Β)

Ανάλυση δειγμάτων απομονωμένης HtdR από τις καλλιέργειες που παρουσιάζονται στο (Α), με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και χρώση με Coomassie brilliant blue. (Γ) Γράφημα που προκύπτει από την απομόνωση με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, της μεμβρανικής πρωτεΐνης HtdR, η οποία παρήχθη σε κύτταρα αγρίου τύπου (MC1061), σε SuptoxR και σε SuptoxR2.2 και είχε προηγουμένως απομονωθεί με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας. (Δ) Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κατά western με χρήση ενός αντί-His αντισώματος σε μικρότερο (αριστερά) και μεγαλύτερο (δεξιά) χρόνο έκθεσης, των ίδιων δειγμάτων που αναλύθηκαν στα (Α) και (Β). MB: Μάρτυρας μοριακού βάρους. Οι αριθμοί που εμφανίζονται υποδεικνύουν τα αντίστοιχα μοριακά βάρη σε kDa.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πρώτον την ύπαρξη φυσικών παραλλαγών της RraA του *E. coli*, που εκφράζονται από τα γονιδιώματα άλλων πρωτεοβακτηρίων ή τους χλωροπλάστες φυτών, οι οποίες μπορούν να δρουν επίσης αποτελεσματικά ως καταστολείς της τοξικότητας που επάγεται από τη διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο, και ως ενισχυτές των τελικών επιπέδων συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, κατ' αναλογία με την αρχική RraA του *E. coli*. Δεύτερον, και πιο σημαντικό, εντοπίστηκαν συγκεκριμένα ομόλογα *rraA* γονίδια, όπως αυτά από τους οργανισμούς *P. mirabilis* και *P. stuartii*, τα οποία συχνά ξεπερνούν σε απόδοση το αρχικό *rraA* γονίδιο του *E. coli* που εκφράζεται στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxR. Χρησιμοποιώντας αυτά τα *rraA* γονίδια που εντοπίστηκαν ως πιο αποτελεσματικοί συμπαράγοντες της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, κατασκευάστηκαν δύο νέα *E. coli* στελέχη SuptoxR δεύτερης γενιάς, τα οποία ονομάστηκαν SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2. Βρέθηκε, ότι είτε ένα από αυτά, είτε και τα δύο μπορούν συχνά να επιτυγχάνουν περαιτέρω αύξηση των επιπέδων συσσώρευσης σωστά αναδιπλωμένων ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης, σε σχέση με το αρχικό SuptoxR στέλεχος. Τέλος, αποδείχθηκε ότι η χρήση των νέων SuptoxR2.X στελεχών επιτρέπει την παραγωγή

μεμβρανικών πρωτεϊνών κατάλληλης ποιότητας και ποσότητας για περαιτέρω βιοχημικές και δομικές μελέτες (Vasilopoulou et al., 2022).



**Εικόνα 29: Χαρακτηριστικά των *E. coli* στελεχών SuptoxR, SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 τα οποία είναι εξειδικεύονται στην παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.** Οι ευεργετικές ιδιότητες των στελεχών αυτών να καταστέλλουν την επαγόμενη από τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση τοξικότητα και να αυξάνουν την παραγωγικότητα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στηρίζεται στην υπερέκφραση των γονιδίων *rraA* από τους οργανισμούς *E. coli* (*Ec rraA*), *P. mirabilis* (*Pm rraA*) και *P. stuartii* (*Ps rraA*), αντίστοιχα. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται από τα πλασμίδια pSuptoxR, pSuptoxR2.1 και pSuptoxR2.2, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *araBAD*.

## **Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>**

### **Ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους SuptoxRNE22**

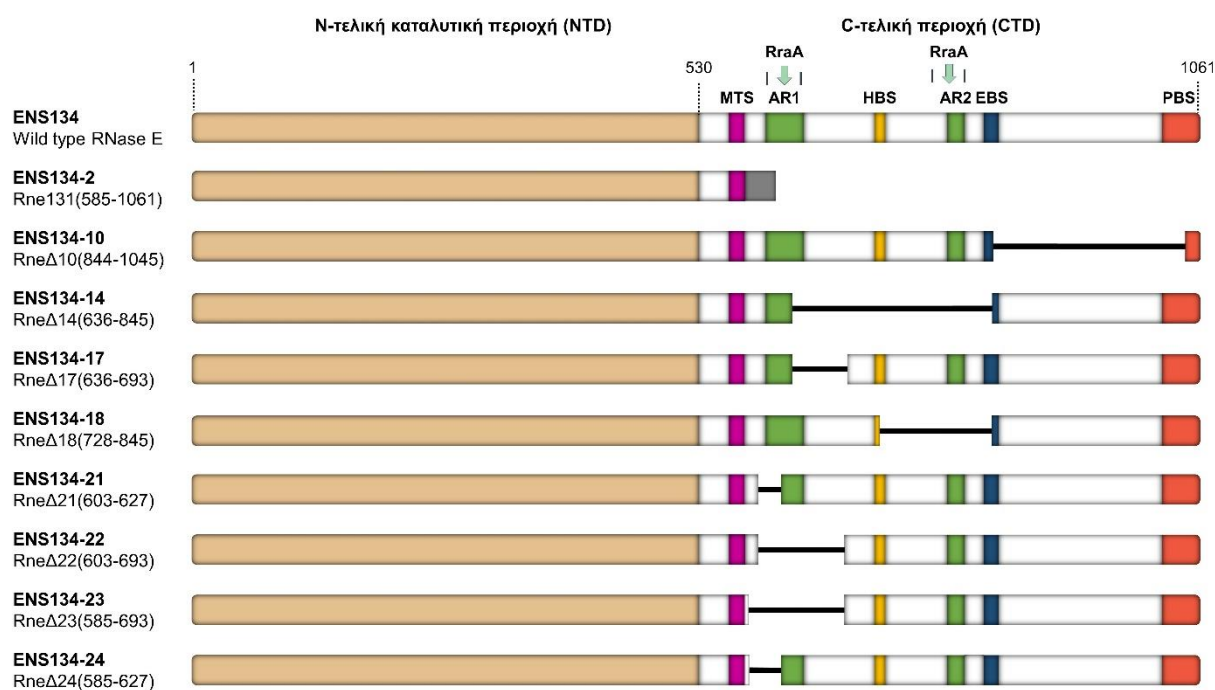
### 3. Ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους SuptoxRNE22

Στο πλαίσιο των προηγούμενων ερευνητικών εργασιών, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, εντοπίστηκε μέσα από μια γενετική σάρωση σε επίπεδο γονιδιώματος, το γονίδιο *rraA* του οργανισμού *E. coli* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη RraA, ως ένας παράγοντας που όταν συνεκφράζεται με ένα εύρος μεμβρανικών πρωτεϊνών, μπορεί και αυξάνει σημαντικά την τελική συγκέντρωση των υγρών καλλιεργειών καθώς και τα επίπεδα συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών σε αυτές (Gialama et al., 2017b). Με βάση αυτά τα δεδομένα, κατασκευάστηκε το βακτηριακό στέλεχος SuptoxR (Gialama et al., 2017b), και τα βελτιωμένα παράγωγα αυτού, τα SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 (Vasilopoulou et al., 2022) που περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.

Η RraA είναι μια πρωτεΐνη η οποία λειτουργεί ως ένας αναστολέας της δράσης της RNάσης E να αποδομεί μόρια mRNA, στο *E. coli* καθώς και σε άλλα βακτήρια (Lee et al., 2003). Η RNάση E, η οποία κωδικοποιείται στο γονιδίωμα του *E. coli* από το γονίδιο *rne*, είναι μια μεγάλη ενδονουκλεάση χωρίς εξειδικευμένη δράση, που αποτελεί έναν από τους πιο βασικούς κυτταρικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην αποδόμηση ενός εύρους μορίων mRNA στο *E. coli*, και είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των βακτηρίων (Caruthers et al., 2006). Η RNάση E του *E. coli*, αποτελείται από 1061 αμινοξικά κατάλοιπα και χωρίζεται σε δύο διακριτές λειτουργικές περιοχές: μια υψηλά συντηρημένη N-τελική περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για τη ριβονουκλεολυτική της δράση, και μια C-τελική περιοχή που δεν διαθέτει σαφή δομή (intrinsically disordered) και αποτελεί τη βάση με την οποία αλληλεπιδρούν μια σειρά άλλων πρωτεϊνών (**Εικόνα 30**) (Callaghan et al., 2004; Khemici et al., 2008). Η αποδόμηση των mRNA μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου, πραγματοποιείται είτε αποκλειστικά από την RNάση E, είτε από ένα πολύ-λειτουργικό ενζυμικό σύμπλοκο που δημιουργείται με αλληλεπίδραση της ενδονουκλεάσης με μια σειρά επιπλέον πρωτεϊνών, που ονομάζεται RNA αποικοδομώσωμα (RNA degradosome) (Carpousis, 2007). Αυτό το μοριακό

σύμπλοκο που χρησιμοποιείται από το βακτήριο για την αποδόμηση μορίων RNA, δημιουργείται με την C-τελική περιοχή της RNάσης E ως πυρήνα, πάνω στον οποίο συνδέονται τρία επιπλέον ένζυμα: μια πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση (PNPase), η ελικάση RhlB (DEAD-box helicase RhlB) της οποίας η λειτουργία εξαρτάται από το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, το ATP, και το γλυκολυτικό ένζυμο ενολάση (enolase) (Carpousis, 2007). Η RraA αλληλεπιδρά φυσιολογικά επίσης με την C-τελική περιοχή της RNάσης και αναστέλλει τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητά της (Gorna et al., 2010).

Σύμφωνα με μια σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι οι ευεργετικές ιδιότητες της RraA στην υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, πραγματοποιούνται μέσω της δράσης της RNάσης E, πιθανότατα λόγω αναστολής της αποδομητικής δράσης της μέσω της υπερέκφρασης του γονιδίου *rnaA*, της επερχόμενης σταθεροποίησης ενός μεγάλου τμήματος του μεταγραφώματος και τελικά της ενίσχυσης της μετάφρασης συγκεκριμένων κυτταρικών παραγόντων, οι οποίοι παραμένουν μέχρι στιγμής άγνωστοι, αλλά εικάζεται πως ενισχύουν τη διαδικασία της βακτηριακής υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών (Gialama et al., 2017a).



**Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση της RNάσης E του *E. coli* και των διαφορετικών παραλλαγών που φέρουν γενετικές απαλοιφές σε τμήματα της C-τελικής περιοχής της, που χρησιμοποιήθηκαν.** Η RNάση E, συνολικού μήκους 1061 αμινοξέων, είναι οργανωμένη σε δύο λειτουργικές περιοχές. Την N-τελική περιοχή (NTD, αμινοξικά κατάλοιπα 1-529) η οποία προσδίδει την καταλυτική δράση στην RNάση E. Την C-τελική περιοχή (CTD, αμινοξικά κατάλοιπα 530-1031) στην οποία πραγματοποιούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και αποτελεί τη βάση δημιουργίας του RNA αποικοδομοσώματος (RNA degradosome). Οι μικρότεροι σημαντικοί τομείς που εδράζονται στην C-τελική περιοχή σημειώνονται με διαφορετικά χρώματα: το λευκό χρώμα υποδεικνύει όλες τις εγγενώς μη-διαταγμένες περιοχές, το μωβ χρώμα υποδεικνύει την αλληλουχία στόχευσης στη μεμβράνη (membrane targeting sequence, MTS, αμινοξικά κατάλοιπα 565-582), το πράσινο χρώμα υποδεικνύει τις δύο περιοχές που είναι πλούσιες σε αργινίνη (arginine rich regions, AR1 και AR2, αμινοξικά κατάλοιπα 604-644 και 796-814), το κίτρινο χρώμα υποδεικνύει τη θέση πρόσδεσης της ελικάσης (helicase binding site, HBS, αμινοξικά κατάλοιπα 719-731), το μπλε χρώμα υποδεικνύει τη θέση πρόσδεσης της ενολάσης (enolase binding site, EBS, αμινοξικά κατάλοιπα 834-850) και τέλος το κόκκινο χρώμα υποδεικνύει την θέση πρόσδεσης της PNPάσης (PNPase binding site, PBS, αμινοξικά κατάλοιπα 1021-1031) (Bouvier and Carpousis, 2011). Οι γνωστές θέσεις αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη RraA σημειώνονται με πράσινα βέλη (Gorna et al., 2010).

### **3.1. Βακτηριακά κύτταρα που παράγουν γενετικές απαλοιφές της RNάσης E καταστέλλουν επιτυχώς την κυτταροτοξικότητα που επάγεται κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και ενισχύουν την παραγωγικότητα μεμβρανοπρωτεϊνών**

Σύμφωνα με τα δεδομένα που αποκτήθηκαν στη μέχρι τώρα έρευνα, που υποδεικνύουν ότι ενδεχομένως η μειωμένη δραστηριότητα της RNάσης E βοηθά στην καταστολή της τοξικότητας που επάγεται κατά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και στην αύξηση των επιπέδων συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, διερευνήθηκε επιπλέον το κατά πόσο συγκεκριμένες γενετικές τροποποιήσεις στο γονίδιο *rne*, που κωδικοποιούν για

συγκεκριμένες παραλλαγές της RNάσης E οι οποίες φέρουν γενετικές απαλοιφές στην C-τελική τους περιοχή, και παρουσιάζουν μειωμένη ριβονουκλεολυτική δραστικότητα, μπορούν επίσης να επιφέρουν τα ίδια ευεργετικά αποτελέσματα ως προς την υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών, με τρόπο που μοιάζει με τις συνθήκες υπερέκφρασης του γονιδίου *rraA* στο SuptoxR στέλεχος. Όπως αναφέρθηκε, η δραστικότητα της RNάσης E είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των βακτηριακών κυττάρων, συνεπώς η πλήρης διαγραφή του γονιδίου *rne* δεν είναι δυνατή. Παρόλα αυτά, καθώς μόνο η N-τελική περιοχή της RNάσης E είναι απαραίτητη για την εκτέλεση της καταλυτικής της δράσης και για την επιβίωση των κυττάρων που την εκφράζουν, χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη εννέα γενετικά τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη *E. coli* που κατασκευάστηκαν στο παρελθόν, και φέρουν στο χρωμόσωμά τους διαφορετικές γενετικές απαλοιφές του γονιδίου *rne* (ENS134-X στελέχη) (**Εικόνα 30, Πίνακας 6**) (Leroy et al., 2002). Τα στελέχη αυτά εκφράζουν είτε ολόκληρη την RNάση E (ENS134) όπως φυσιολογικά παράγεται στα *E. coli* κύτταρα αγρίου τύπου, είτε παραλλαγές αυτής που φέρουν απαλοιφές τμημάτων της C-τελικής περιοχής της ενδονουκλεάσης (ENS134-10 – ENS134-24) ή την πλήρη διαγραφή της περιοχής αυτής (ENS134-2) (Lopez et al., 1999). Τα κύτταρα τα οποία παράγουν τις γενετικά τροποποιημένες εκδοχές της RNάσης E, όπως προσδιορίστηκε είναι βιώσιμα και εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ριβονουκλεολυτικής δραστηριότητας, σε όλες τις περιπτώσεις πλην μιας (ENS134-10) (Lopez et al., 1999).

Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα καταστολής της επαγόμενης τοξικότητας κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και της παραγωγικότητας ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών στα στελέχη που εκφράζουν τις γενετικές παραλλαγές της RNάσης E, χρησιμοποιήθηκε ως μεμβρανική πρωτεΐνη-μοντέλο και πάλι ο υποδοχέας της βραδυκινίνης 2 (BR2), λόγω της υψηλής κυτταροτοξικότητας που εμφανίζεται κατά την υπερέκφρασή του στο *E. coli* (Link et al., 2008; Gialama et al., 2017b). Και σε αυτή την περίπτωση προκειμένου να παρακολουθούνται εύκολα τα επίπεδα παραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης που έχει εισαχθεί

στη μεμβράνη, ακολουθήθηκε η ίδια στρατηγική της χρήσης της πρωτεϊνικής χίμαιρας της BR2 με την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (enhanced green fluorescent protein, EGFP) στο C-τελικό άκρο (Drew et al., 2001).

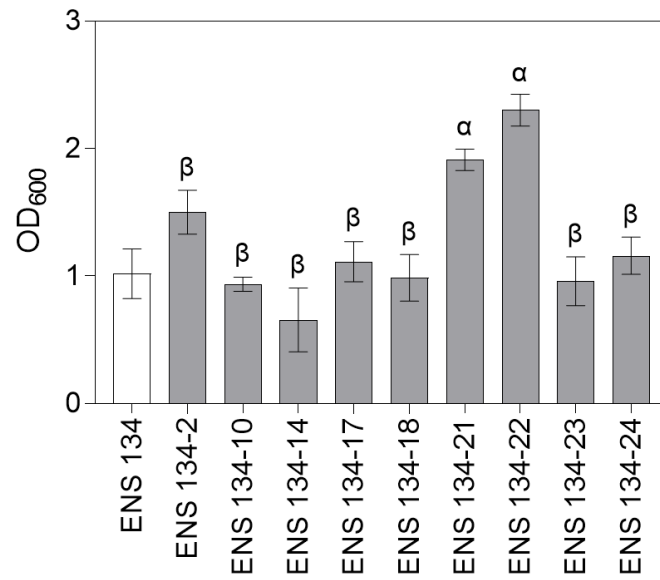
Η πιθανή ευεργετική επίδραση των διαφορετικών μεταλλαγμάτων του *rne* γονιδίου στην καταστολή της τοξικότητας που προκαλείται κατά την υπερπαραγωγή της BR2, διερευνήθηκε μέσω της καταγραφής των τελικών επιπέδων ανάπτυξης καλλιιεργειών *E. coli* κυττάρων, τα οποία εκφράζουν την αγρίου τύπου RNάση E (στελέχος ENS134) ή μια από τις εννέα διαφορετικές παραλλαγές της RNάσης E (στελέχη ENS134-X), και στα οποία έχει επαχθεί η υπερέκφραση της πρωτεϊνικής χίμαιρας BR2-GFP από τον πλασμιδιακό φορέα pASK75 (Skerra, 1994), μετά από προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας του μορίου-επαγωγέα ανυδροτετρακυκλίνη (aTc). Τα τελικά επίπεδα ανάπτυξης της κάθε βακτηριακής καλλιέργειας υπολογίστηκαν με βάση την οπτική πυκνότητα στα 600 nm, μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, τα βακτηριακά στελέχη ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22, τα οποία φέρουν αντίστοιχα τις γενετικές απαλοιφές *rne131*, *rneΔ21* και *rneΔ22*, παρουσιάζουν αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη κατά τη συλλογή τους (**Εικόνα 31, Α**). Πιο συγκεκριμένα, στα βακτηριακά κύτταρα ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22 επετεύχθη αύξηση της τάξης του 47-126 % στην τελική οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>), γεγονός που υποδεικνύει ότι η ισχυρή κυτταροτοξικότητα που σχετίζεται με τη διαδικασία της υπερέκφρασης της BR2, είναι σημαντικά μειωμένη στα συγκεκριμένα στελέχη. Η σύγκριση των τελικών επιπέδων συσσώρευσης ανασυνδυασμένης BR2-GFP στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηριακών στελεχών, δηλαδή η σύγκριση της σχετικής παραγωγικότητας σε μεμβρανοπρωτεΐνη ανά κύτταρο, πραγματοποιήθηκε μέσω μέτρησης του σχετικού GFP φθορισμού μεμονωμένων κυττάρων από τα διαφορετικά στελέχη τα οποία παρήγαγαν τη συγκεκριμένη πρωτεϊνική χίμαιρα, με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Ο φθορισμός ανά κύτταρο βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένος στις καλλιέργειες των στελεχών ENS134-2, ENS134-21

και ENS134-22 που παρήγαγαν τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP, σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου κύτταρα ENS134, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη σημαντικά ενισχυμένης κυτταρικής συσσώρευσης μεμβρανοπρωτεΐνης στα συγκεκριμένα στελέχη (**Εικόνα 31, Β**). Έτσι, φαίνεται ότι τα μεμονωμένα κύτταρα από τα τρία βακτηριακά στελέχη ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22, είναι ικανά να καταστέλλουν την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση της BR2 και, ταυτόχρονα, να συσσωρεύουν αυξημένα επίπεδα ανασυνδυασμένης BR2, η οποία κατά τα άλλα εκφράζεται ανεπαρκώς και προκαλεί εξαιρετικά μεγάλη κυτταροτοξικότητα.

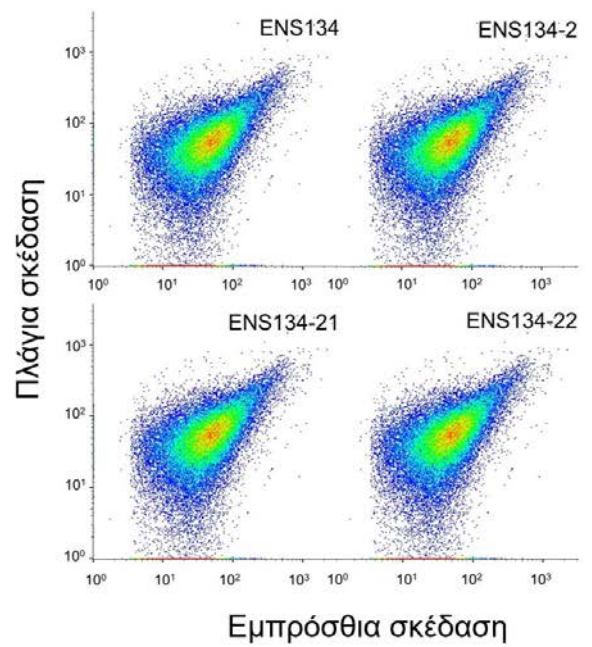
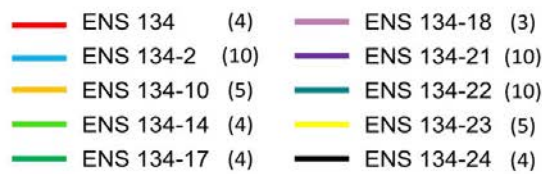
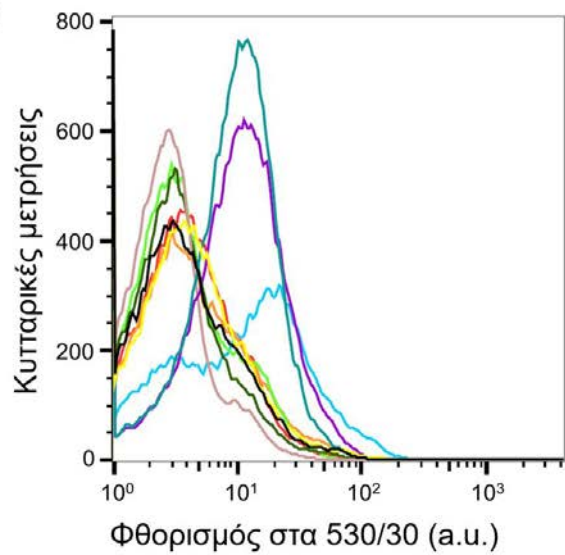
Όπως και στην περίπτωση των SuptoxR κυττάρων πρώτης και δεύτερης γενιάς, ο συνδυασμός της αύξησης της τελικής πυκνότητας της καλλιέργειας λόγω καταστολής της τοξικότητας, και της ενισχυμένης παραγωγής μεμβρανοπρωτεΐνης ανά κύτταρο στα στελέχη ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22, οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα σχετικού GFP φθορισμού που αντιστοιχεί σε ίσο όγκο βακτηριακών καλλιεργειών που εκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP (**Εικόνα 31, Γ**). Συγκεκριμένα, στα βακτηριακά κύτταρα ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22 επετεύχθη αύξηση του σχετικού GFP φθορισμού κατ' όγκο, που κυμαίνεται από 40 % έως 430 %, με τα πιο αυξημένα αποτελέσματα να καταγράφονται για το ENS134-22 στέλεχος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κλασμάτων ολικών μεμβρανών που προέρχονται από τα στελέχη ENS134, ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22, με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), συνδυαστικά με ανοσοαποτύπωση κατά western. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης προκύπτει ότι οι αυξήσεις που παρατηρήθηκαν στο φθορισμό, προκαλούνται όντως από τα αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης ανασυνδυασμένης BR2-GFP στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων κάθε στελέχους, και επιπλέον αυτή η ενισχυμένη παραγωγικότητα είναι ιδιαίτερα εμφανής στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του στελέχους ENS134-22 (**Εικόνα 31, Δ**).

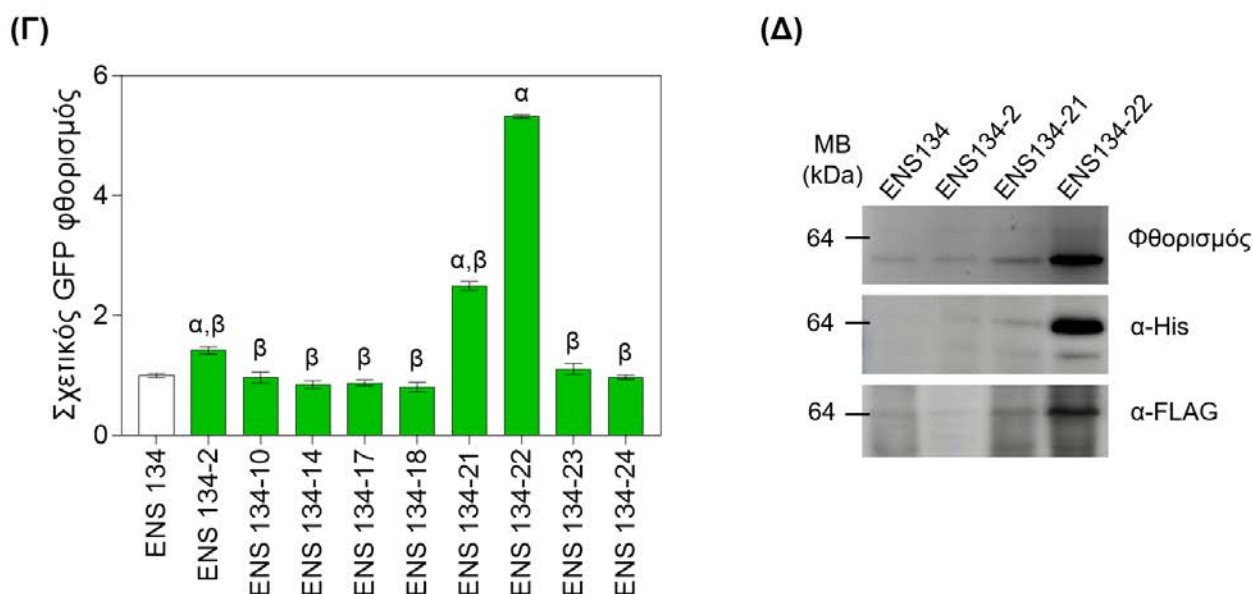
Επιπλέον, προκειμένου να ελεγχθεί το κατά πόσο η μεμβρανική πρωτεΐνη που παράγεται διαμορφώνει σωστή αναδίπλωση, αναλύθηκε ο ενδοπηκτικός φθορισμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες και προέρχονταν από τα κλάσματα ολικών απομονωμένων μεμβρανών από τις καλλιέργειες των στελεχών ENS134, ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22. Όπως αναφέρθηκε και στην **Παράγραφο 2.2**, η μέθοδος αυτή έχει βρεθεί ότι παρέχει μια αξιόπιστη προσέγγιση ως προς την ποσότητα της πρωτεΐνης που παράγεται σε σωστά αναδιπλωμένη μορφή (Geertsma et al., 2008) και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον ποιοτικό έλεγχο ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που εκφράζονται στο βακτήριο (Mathieu et al., 2019; Cuesta Bernal et al., 2021; Yousefian et al., 2021). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι τα βακτηριακά στελέχη ENS134-21 και ENS134-22 επιτυγχάνουν αύξηση της συσσώρευσης ανασυνδυασμένης BR2-GFP στη μεμβράνη των κυττάρων, η οποία βρίσκεται σε σωστά αναδιπλωμένη μορφή (**Εικόνα 31, Δ**). Το σύνολο αυτών των πειραμάτων υποδηλώνει την ύπαρξη συγκεκριμένων γενετικών τροποποιήσεων του γονιδίου *rne*, οι οποίες όταν εκφράζονται παρουσιάζουν μειωμένη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα, και οδηγούν σε σημαντική καταστολή της τοξικότητας που επάγεται κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και σε δραματικά αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης σωστά αναδιπλωμένων μεμβρανοπρωτεϊνών στη βακτηριακή μεμβράνη. Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα αυτά, μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με τις ιδιότητες του *E. coli* SuptoxR στελέχους, στο οποίο η δράση της RNάσης E περιορίζεται μέσω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης-αναστολέα της, της RraA (Gialama et al., 2017b).

(A)



(B)





**Εικόνα 31: Στελέχη *E. coli* που εκφράζουν παραλλαγές της RNάσης E με γενετικές απαλοιφές στην C-τελική περιοχή, καταστέλλουν την επαγόμενη από την μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση κυτταροτοξικότητα και ενισχύουν τη συσσώρευση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.** (Α) Τελικά επίπεδα ανάπτυξης βακτηριακών καλλιεργειών που εκφράζουν την αγρίου τύπου RNάση E (ENS134) ή μια από τις εννέα παραλλαγές της (ENS134-X) και στις οποίες έχει επαχθεί η παραγωγή της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2-GFP. OD<sub>600</sub>: οπτική απορρόφηση στα 600 nm. (Β) Σχετικός GFP φθορισμός μεμονωμένων κυττάρων των διαφορετικών ENS134-X στελεχών που παράγουν την πρωτεϊνική χίμαιρα BR2-GFP, όπως μετρήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Οι αριθμοί εντός των παρενθέσεων αντιστοιχούν στο μέσο όρο του φθορισμού ανά κύτταρο κάθε καλλιέργειας. (Γ) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου καλλιέργειας των διαφορετικών βακτηριακών κυττάρων ENS134-X που παράγουν την μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP, σε σύγκριση με την καλλιέργεια των κυττάρων του στελέχους ENS134 που εκφράζει την αγρίου τύπου RNάση E. (Δ) Ανάλυση κλασμάτων απομονωμένων ολικών μεμβρανών από τις καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών ENS134, ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22 που παράγουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP, με χρήση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες. Η εμφάνιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του ενδοπηκτικού φθορισμού (πάνω) και ανοσοαποτύπωση κατά western με χρήση ενός α-FLAG αντισώματος που υβριδίζει στο αντίστοιχο επίτοπο στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και με ένα α-His αντίσωμα που υβριδίζει στο C-τελικό άκρο της. Σε όλα τα σχήματα η BR2-GFP εκφράστηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pASKBR2-EGFP. Στο (Α) και στο (Γ) οι τιμές που αναφέρονται αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, κάθε ένα εκ των

οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$ s.e.m., το γράμμα α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα ENS134 ( $p < 0.05$ ), ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα ENS134-22 ( $p < 0.05$ ).

### **3.2. *E. coli* κύτταρα που εκφράζουν τη γενετική απαλοιφή RneΔ22 παρουσιάζουν ενισχυμένη παραγωγικότητα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης**

Ανάμεσα στα εννέα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν, τα οποία φέρουν γενετικές απαλοιφές στο γονίδιο *rne* που κωδικοποιεί την ενδονουκλεάση RNάση E, τα ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22, ήταν αυτά στα οποία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τελικών επιπέδων συσσώρευσης βιομάζας και ανασυνδυασμένης BR2-GFP στις κυτταρικές μεμβράνες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι, το *E. coli* στέλεχος ENS134-22, που φέρει τη μεταλλαγή RneΔ22, ήταν το πιο αποτελεσματικό από όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν, τόσο ως προς την καταστολή της τοξικότητας ( $> 2$  φορές αύξηση της τελικής οπτικής πυκνότητας στα 600nm) όσο και ως προς την προώθηση της μεμβρανοπρωτεϊνικής παραγωγικότητας ( $> 2.5$  φορές αύξηση της παραγωγικότητας ανά κύτταρο,  $>5$  φορές αύξηση της παραγωγικότητας κατ' όγκο), σε σύγκριση με το στέλεχος ENS134 που εκφράζει την αγρίου τύπου RNάση E (**Εικόνα 31**).

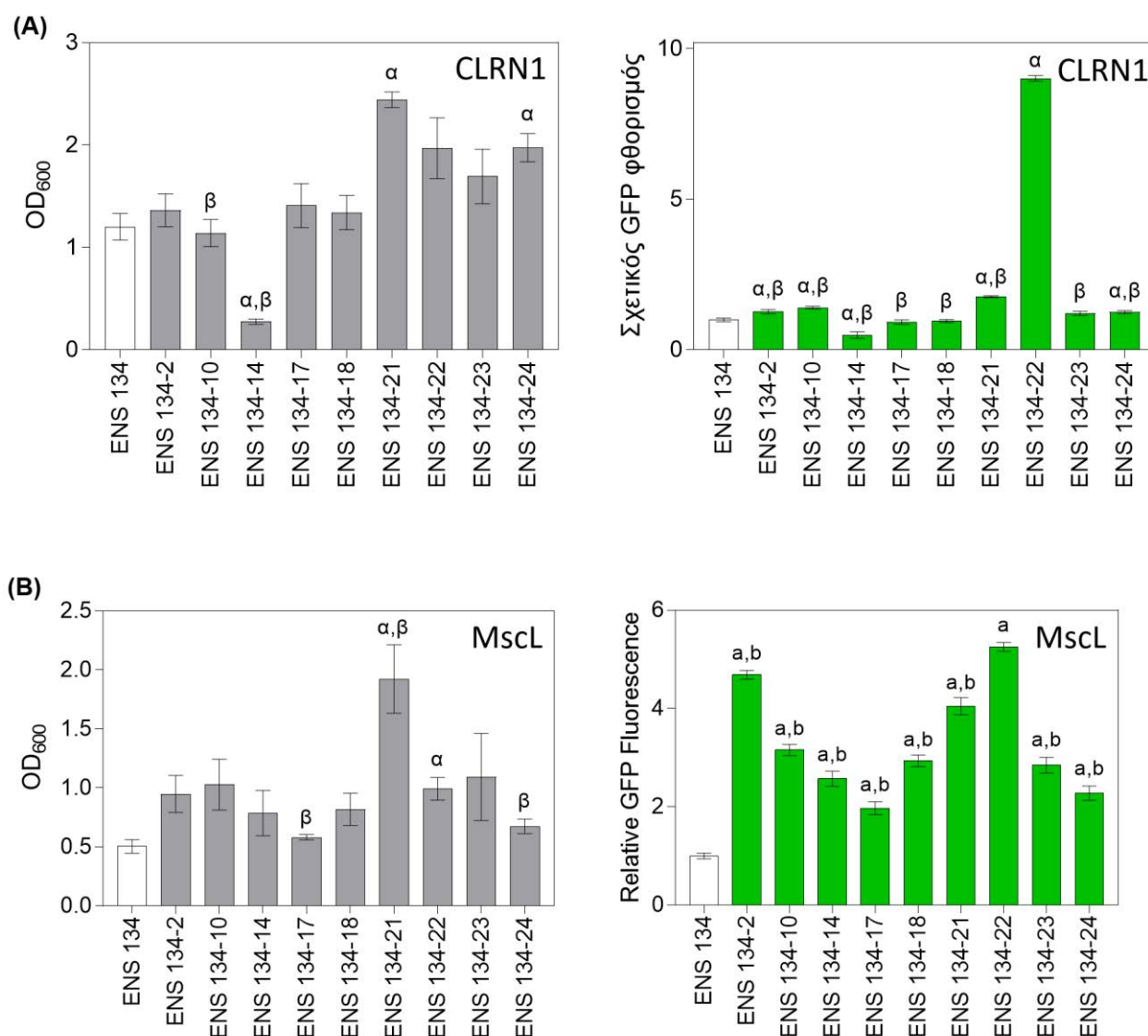
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε το κατά πόσο η θετική επίδραση της μεταλλαγής RneΔ22 στην παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών που παρατηρήθηκε είναι γενική και μπορεί να εφαρμοστεί σε περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες ή αν εμφανίζεται αποκλειστικά στην περίπτωση της BR2-GFP. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν τρεις επιπλέον ανασυνδυασμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης, οι οποίες υπερεκφράστηκαν στο σύνολο των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, και υπολογίστηκε ξανά η τελική συσσώρευση

βιομάζας και η παραγωγικότητα κατ' όγκο στις καλλιέργειες που προέκυψαν. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν η ανθρώπινη μεμβρανοπρωτεΐνη clarin-1 που μοιάζει δομικά με τις τετρασπανίνες (CLRN1), το κανάλι ιόντων υψηλής αγωγιμότητας από τον οργανισμό *Mycobacterium tuberculosis* (MscL) και η δελτα-ροδοψίνη από τον οργανισμό *Haloterrigena turkmenica* (HtdR).

Η υπερέκφραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών CLRN1-GFP και MscL-GFP στο σύνολο των διαφορετικών *E. coli* στελεχών που εκφράζουν γενετικές απαλοιφές της RNάσης E, οδήγησε σε καταστολή της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, σε σχέση με τα επίπεδα ανάπτυξης του στελέχους ENS134, στο οποίο παράγεται η αγρίου τύπου RNάση E. Στις καλλιέργειες που εκφράστηκε η ευκαρυωτική διαμεμβρανική πρωτεΐνη CLRN1-GFP, οι τιμές της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm παρουσίασαν αύξηση της τάξης του 11 – 103 %, σε σύγκριση με την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας των κυττάρων του στελέχους ENS134, σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από δύο (ENS134-10 και ENS134-14) (**Εικόνα 32, Α αριστερά**), ενώ στην περίπτωση υπερέκφρασης της προκαρυωτικής μεμβρανοπρωτεΐνης MscL-GFP, όλα τα στελέχη που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *rne*, παρουσίασαν αύξηση των τελικών επιπέδων ανάπτυξης των καλλιεργειών (15-280% αυξημένη οπτική πυκνότητα στα 600 nm) (**Εικόνα 32, Β αριστερά**). Επιπλέον, οι μετρήσεις του σχετικού GFP φθορισμού ίσου όγκου καλλιεργειών, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι περισσότερες παραλλαγές της πρωτεΐνης RNάση E, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα διαφορετικά *rne* γονίδια που φέρουν γενετικές απαλοιφές, ενίσχυσαν την παραγωγικότητα της ανασυνδυασμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CLRN1-GFP (20-800 % αύξηση του σχετικού GFP φθορισμού κατ' όγκο) (**Εικόνα 32, Α δεξιά**), ενώ τα επίπεδα συσσώρευσης της ανασυνδυασμένης μεμβρανοπρωτεΐνης MscL-GFP ενισχύθηκαν επίσης σε σύγκριση με το ENS134 στέλεχος, σε όλες τις περιπτώσεις (97-425 % αύξηση του σχετικού GFP φθορισμού κατ' όγκο) (**Εικόνα 32, Β δεξιά**). Μεταξύ όλων των στελεχών που μελετήθηκαν, οι καλλιέργειες του στελέχους ENS134-22 που εκφράζουν μεμβρανοπρωτεϊνικές

χίμαιρες με την GFP ήταν αυτές που εμφάνισαν τις πιο έντονες αυξήσεις στα επίπεδα φθορισμού ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας, που κυμάνθηκε μεταξύ 425-800 %, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο ότι τα *E. coli* κύτταρα που εκφράζουν την παραλλαγή RneΔ22 της RNάσης E, μπορούν να έχουν βελτιωμένη απόδοση κατά την παραγωγή μιας ποικιλίας ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.

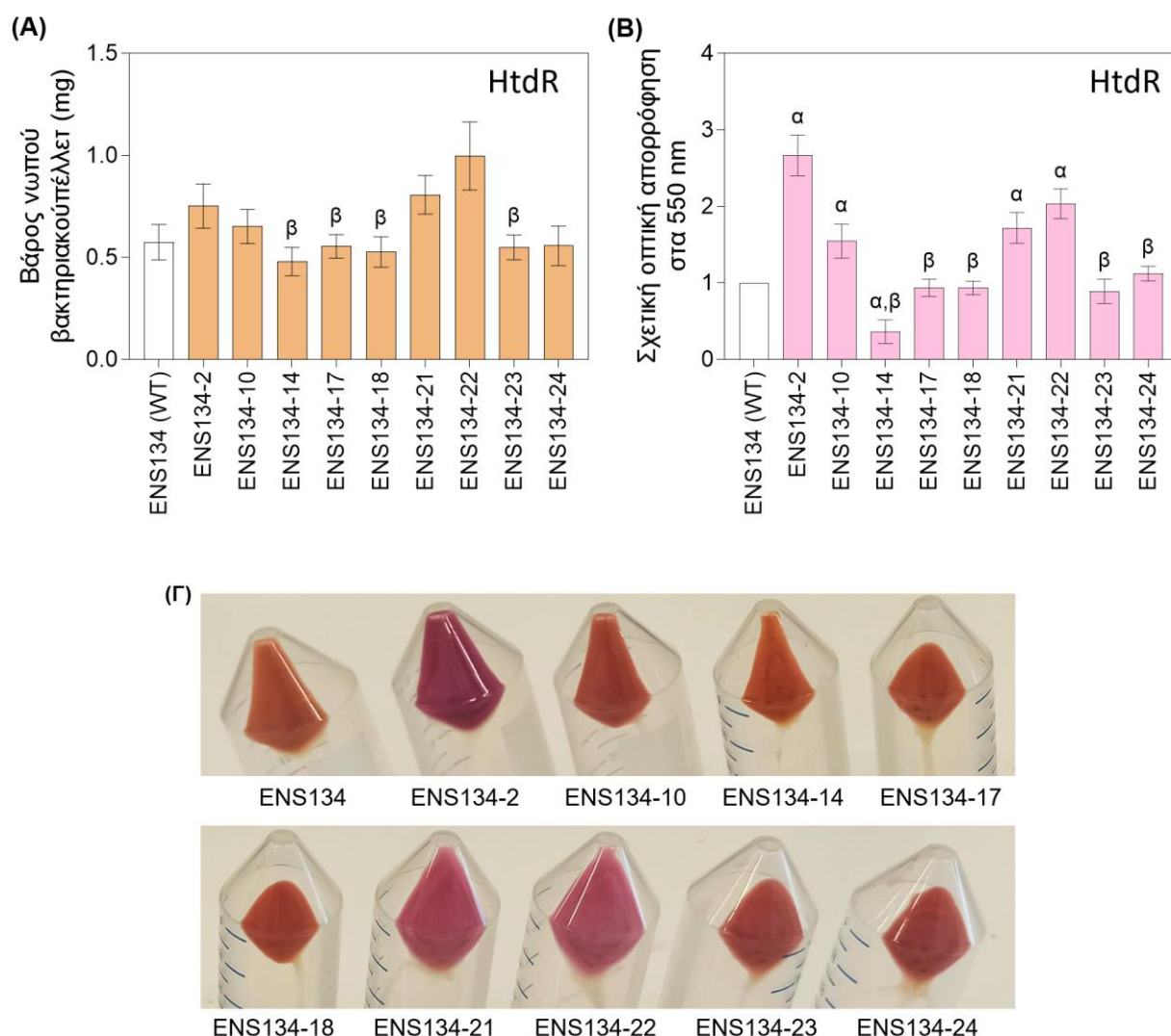
Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι οι τομείς της RNάσης E των οποίων η διαγραφή οδηγεί σε κατεσταλμένη τοξικότητα που επάγεται από τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση και σε ενισχυμένη παραγωγικότητα ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, φαίνεται να είναι εξαιρετικά εξειδικευμένες. Για παράδειγμα, το στελέχος ENS134-22 που βρέθηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό στην παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, διαφέρει ελάχιστα σε σχέση με το ENS134-23 (διαφορά 18 αμινοξέων), το οποίο είχε πολύ μικρή επίδραση στην παραγωγικότητα ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Ομοίως, μεταξύ του ζεύγους ENS134-10 και ENS134-14, αν και υπάρχει μια εξίσου μικρή διαφορά 18 αμινοξικών καταλοίπων, η διαφορά στην επίδραση που έχουν στην παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση που συγκρίνεται η αποτελεσματικότητα του ENS134-2 με τα ENS134-10 και ENS134-14, καθώς τα αποτελέσματα διαφέρουν αρκετά παρά το γεγονός ότι σε κάθε ένα από τα δύο στελέχη εκφράζεται περίπου το 50 % από το έλλειμμα του ENS134-2 (**Εικόνα 30, Εικόνα 31, Εικόνα 32**).



**Εικόνα 32: Βακτηριακά κύτταρα που εκφράζουν την παραλλαγή RneΔ22 της RNάσης E αυξάνουν την παραγωγικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών CLRN1-GFP και MscL-GFP.** (A) Τελικά επίπεδα ανάπτυξης (αριστερά) και σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου καλλιιεργειών (δεξιά) βακτηριακών κυττάρων που εκφράζουν την αγρίου τύπου RNάση E (ENS134) ή μια από τις εννέα μεταλλαγές που εκφράζουν γενετικές απαλοιφές της ενδονουκλεάσης (ENS134-X) και στα οποία έχει επαχθεί η παραγωγή της ευκαρυωτικής μεμβρανοπρωτεΐνης CLRN1-GFP από το πλασμίδιο pASKCLRN1-EGFP. (B) Τα ίδια διαγράμματα για βακτηριακές καλλιέργειες που εκφράζουν την προκαρυωτικής προέλευσης μεμβρανική πρωτεΐνη MscL-GFP που παράγεται από το πλασμίδιο pASKMscL-EGFP. Οι τιμές που αναφέρονται αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$ s.e.m., το γράμμα α υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση

με το δείγμα ENS134 ( $p < 0.05$ ), ενώ το  $\beta$  υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα ENS134-22 ( $p < 0.05$ ).

Το τέταρτο παράδειγμα ανασυνδυασμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης που μελετήθηκε ήταν η ροδοψίνη HtdR, η οποία όπως αναφέρθηκε λειτουργεί ως μια εξαρτώμενη από το φως αντλία πρωτονίων, που προσδένει το χρωμοφόρο *all-trans*-ρετινάλη και αποκτά ένα χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα με μέγιστο απορρόφησης στα 550 nm (Kamo et al., 2006), και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των επιπέδων παραγωγής λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τις μετρήσεις του βάρους του νωπού κατακρημνισμένου βακτηριακού πληθυσμού που προέρχεται από καλλιέργειες που υπερεκφράζουν την HtdR στα διαφορετικά ENS134-X στελέχη και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση μετά το πέρας της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, παρατηρήθηκε ότι στα στελέχη ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22 τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης βιομάζας ήταν μεγαλύτερα σε σχέση με το αγρίου τύπου *E. coli* στέλεχος ENS134 (**Εικόνα 33, Α, Γ**). Επιπλέον, η παραγωγή σωστά αναδιπλωμένης και λειτουργικής ανασυνδυασμένης HtdR, ήταν επίσης αυξημένη στα ίδια στελέχη (ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22), όπως υπολογίστηκε με βάση τις μετρήσεις της σχετικής ποσότητας μεμβρανοπρωτεΐνης που έφερε συνδεδεμένο το χρωμοφόρο και είχε εξαχθεί από τις μεμβράνες ίσου όγκου καλλιιεργειών, με χρήση της επιφανειοενεργής ουσίας DDM, μετά το τέλος της διαδικασίας της υπερέκφρασης (**Εικόνα 33, Β**).



**Εικόνα 33: *E. coli* κύτταρα που εκφράζουν την παραλλαγή RneΔ22 της RNάσης E αυξάνουν την παραγωγικότητα της ροδοψίνης HtdR.** (Α) Βάρος νωπού κατακρημνισμένου βακτηριακού πληθυσμού που συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση μετά το πέρας της διαδικασίας της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, ίσου όγκου καλλιέργειών ENS134 και ENS134-X κυττάρων που εκφράζουν τη βακτηριακή ροδοψίνη HtdR. (Β) Σχετική απορρόφηση στα 550 nm της HtdR που έχει εξαχθεί από τις μεμβράνες ίσου όγκου βακτηριακών καλλιεργειών ENS134 και ENS134-X στελεχών, με χρήση της επιφανειοενεργής ουσίας DDM. (Γ) Βακτηριακό πέλλετ χαρακτηριστικού ιώδους χρώματος που προέκυψε από φυγοκέντρηση ίσου όγκου καλλιεργειών ENS134 και ENS134-X κυττάρων που εκφράζουν τη ροδοψίνη HtdR παρουσία 10  $\mu$ M all-*trans*-ρετινάλης. Οι τιμές που αναφέρονται στα (Α) και (Β) αντιστοιχούν στο μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$ s.e.m., το γράμμα α υποδεικνύει

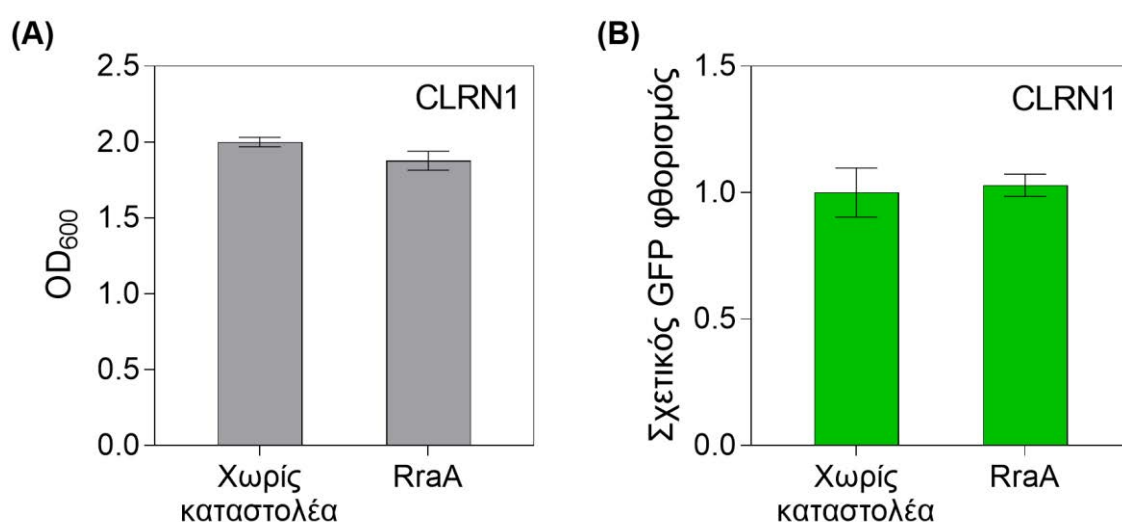
στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα ENS134 ( $p < 0.05$ ), ενώ το β υποδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα ENS134-22 ( $p < 0.05$ ).

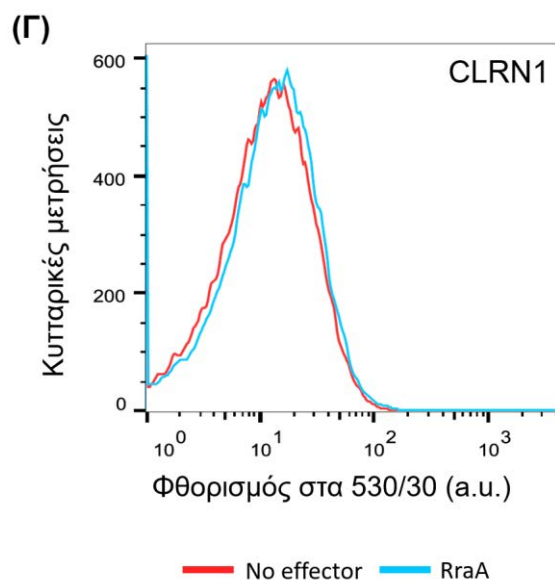
Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στις **Εικόνες 31, 32 και 33**, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα στελέχη ENS134-2, ENS134-21 και ENS134-22 ενίσχυσαν την παραγωγικότητα όλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών που δοκιμάστηκαν. Μεταξύ αυτών, το στέλεχος ENS134-22 ήταν μακράν το πιο αποτελεσματικό στην περίπτωση των δύο ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών ευκαρυωτικής προέλευσης που μελετήθηκαν και το καλύτερο ή ένα από τα καλύτερα στην περίπτωση των δύο προκαρυωτικών πρωτεϊνών. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτά τα αποτελέσματα, το ENS134-22 παρουσιάζεται ως ένα νέο βακτηριακό στέλεχος κατάλληλο για την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις. Με βάση τις ιδιότητές του και σε αναλογία με το αρχικό στέλεχος SuptoxR, το στέλεχος αυτό ονομάστηκε SuptoxRNE22 (Suppressor of toxicity – deletion 22 in RNase E) (**Εικόνα 39**) (Vasilopoulou et al., submitted). Σημειώνεται ακόμη ότι το ENS134-2 είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος που κυκλοφορεί στην αγορά με το όνομα BL21 Star(DE3) (Invitrogen).

### **3.3. Η συνέκφραση της RraA στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxRNE22 δεν ενίσχυσε περαιτέρω την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών**

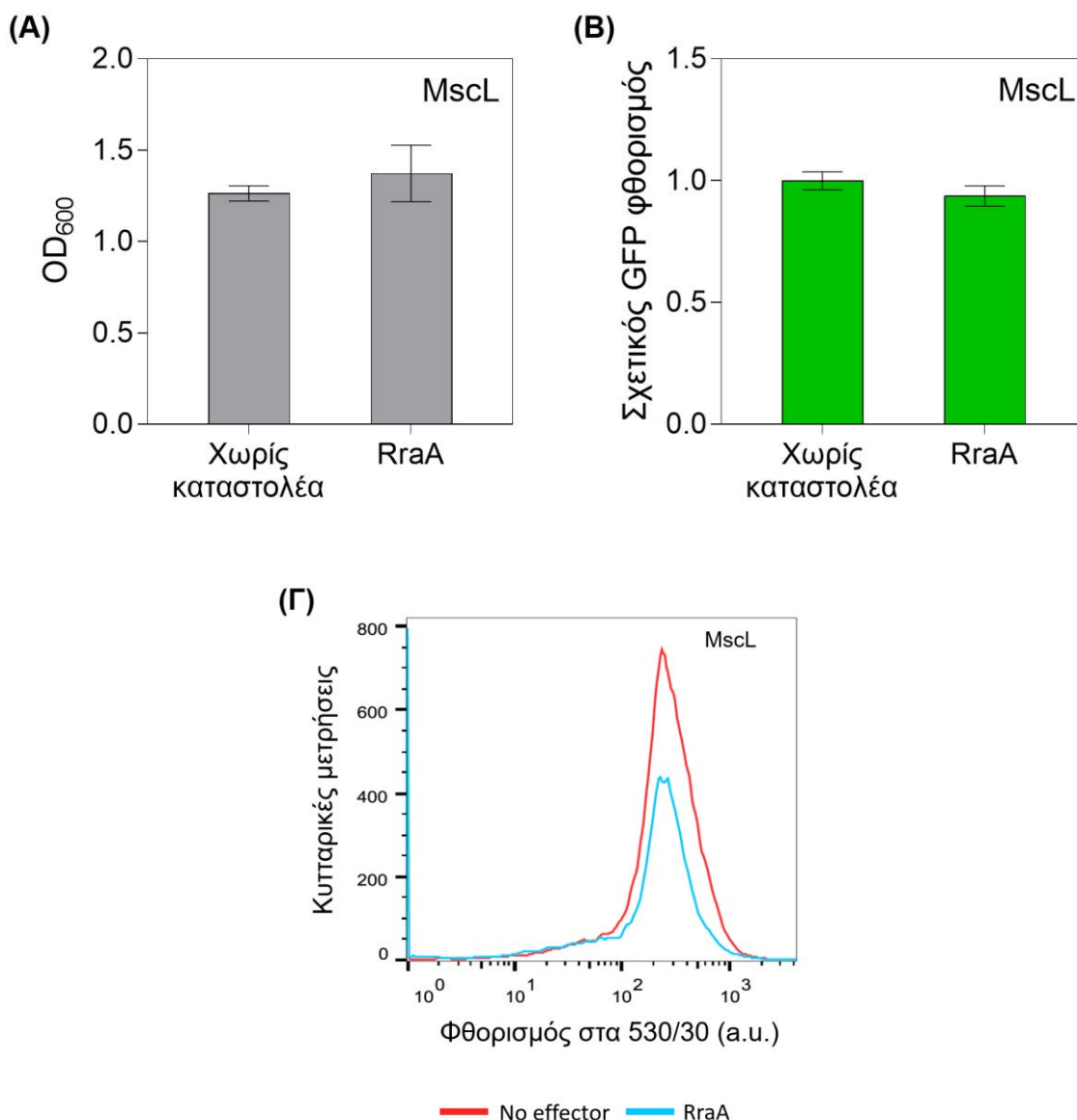
Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα, αποδεικνύεται ότι συγκεκριμένες γενετικές τροποποιήσεις στο *rne* γονίδιο, οι οποίες οδηγούν σε μειωμένη ενζυμική δραστικότητα της ενδονουκλεάσης RNάση E, μπορούν να καταστείλουν σημαντικά την τοξικότητα που επάγεται από την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο και ταυτόχρονα να ενισχύσουν σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, αποτελέσματα τα οποία θυμίζουν αυτά που έχουν παρατηρηθεί σε προηγούμενη έρευνα, όπου η δραστικότητα της

RNάσης E είχε ανασταλεί λόγω υπερέκφρασης του αναστολέα της, της RraA, στο *E. coli* στέλεχος SuptoxR. Έτσι μελετήθηκε το κατά πόσο η περαιτέρω ρύθμιση της δραστηριότητας της RNάσης E μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου *rraA* στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxRNE22, θα μπορούσε να προωθήσει περαιτέρω τις ευεργετικές του ιδιότητες ως προς την διαδικασία παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε προηγούμενη έρευνα είχε βρεθεί ότι η συνέκφραση του γονιδίου *rraA* σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* που φέρουν τη γενετική διαγραφή RneΔ22, οδήγησε σε πολύ μικρή αύξηση της συσσώρευσης της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2, που θεωρείται αμελητέα καθώς η τιμή κινείται μέσα στα όρια του στατιστικού σφάλματος (Gialama et al., 2017a). Προκειμένου να ελεγχθεί το κατά πόσο ισχύει το ίδιο και στις περιπτώσεις υπερέκφρασης άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών, διερευνήθηκαν η τελική βακτηριακή ανάπτυξη, καθώς επίσης και τα τελικά επίπεδα συσσώρευσης των πρωτεϊνών CLRN1-GFP και MscL-GFP στις μεμβράνες ίσου όγκου βακτηριακών κυττάρων του στελέχους SuptoxRNE22, παρουσία και απουσία της συνέκφρασης του γονιδίου *rraA*. Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι ευεργετική επίδραση του στελέχους SuptoxRNE22 δε μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω κατά τη συνέκφραση της RraA πρωτεΐνης, για καμία από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν (Εικόνα 34, Εικόνα 35).





**Εικόνα 34: Η συνέκφραση της πρωτεΐνης RraA σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22 δεν βελτιώνει περαιτέρω την υπερέκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης CLRN1-GFP.** (Α) Τελικά επίπεδα ανάπτυξης *E. coli* κυττάρων του στελέχους SuptoxRNE22 που εκφράζει τη μεμβρανική πρωτεΐνη CLRN1-GFP, χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με (RraA) την ταυτόχρονη συνέκφραση του γονιδίου *rraA*. OD<sub>600</sub>: οπτική απορρόφηση στα 600 nm. (Β) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου των ίδιων καλλιέργειών με το (Α). (Γ) GFP φθορισμός μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων SuptoxRNE22 που παράγουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη CLRN1-GFP, όπως μετρήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Οι αναφερόμενες τιμές στα (Α) και (Β) αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m.



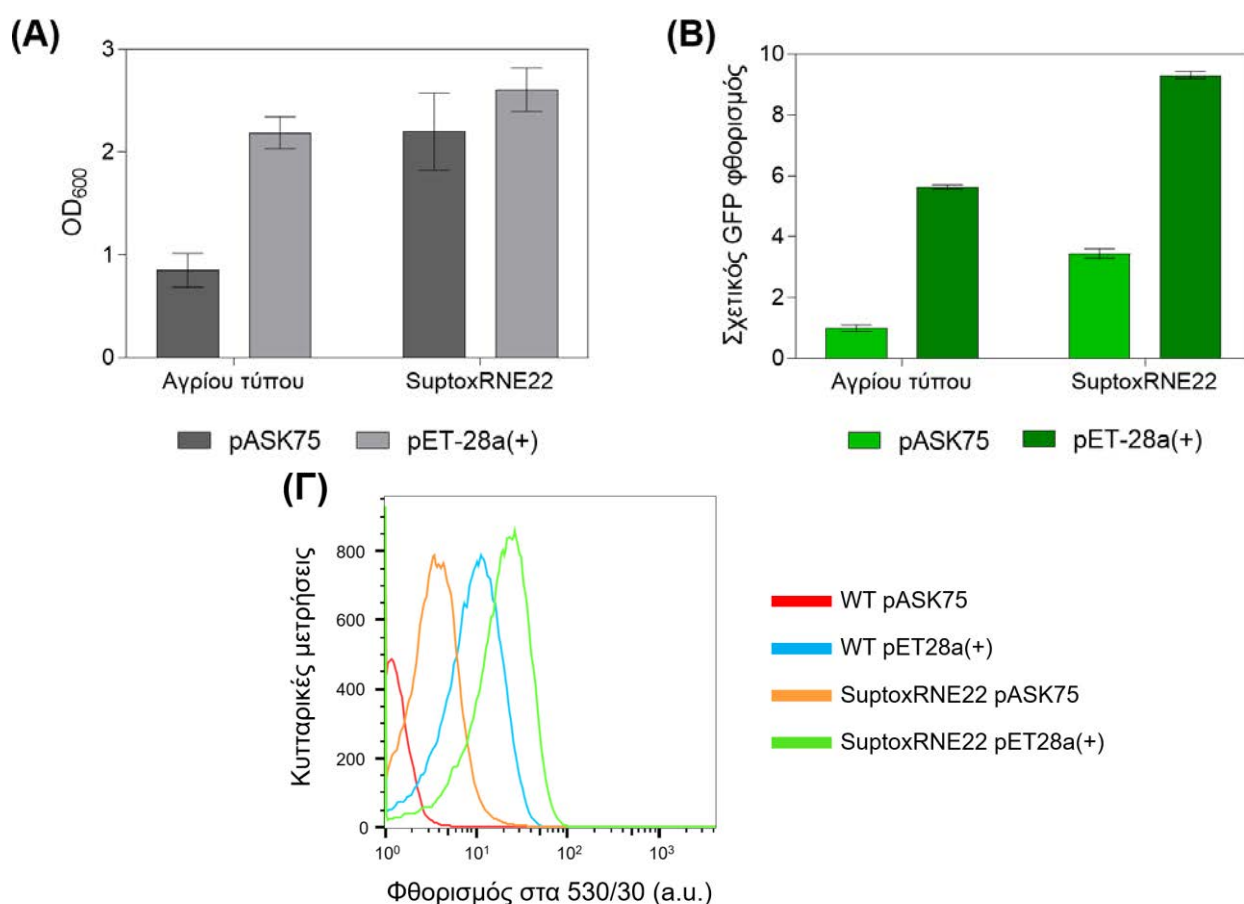
**Εικόνα 35: Η συνέκφραση της πρωτεΐνης RraA σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22 δεν βελτιώνει περαιτέρω την υπερέκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης MscL-GFP.** (Α) Τελικά επίπεδα ανάπτυξης *E. coli* κυττάρων του στελέχους SuptoxRNE22 που εκφράζει τη μεμβρανική πρωτεΐνη MscL-GFP, χωρίς (χωρίς καταστολέα) και με (RraA) την ταυτόχρονη συνέκφραση του γονιδίου *rraA*. OD<sub>600</sub>: οπτική απορρόφηση στα 600 nm. (Β) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου των ίδιων καλλιέργειών με το (Α). (Γ) GFP φθορισμός μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων SuptoxRNE22 που παράγουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη MscL-GFP, όπως μετρήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Οι αναφερόμενες τιμές στα (Α) και (Β) αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m.

### **3.4. Το *E. coli* στέλεχος SuptoxRNE22 μπορεί να αποτελέσει έναν ξενιστή ευρείας εφαρμογής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών**

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει ένας οργανισμός-ξενιστής που θα είναι κατάλληλος για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, είναι η ευρεία εφαρμογή του και η συμβατότητα με τα διαφορετικά πλασμιδιακά συστήματα που χρησιμοποιούνται για τη βακτηριακή έκφραση πρωτεϊνών και τους αντίστοιχους εκκινητές τους. Η πλασμιδιακή σειρά pET, αποτελεί την κατηγορία πλασμιδίων που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο βακτήριο. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου-στόχου και η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων των αντίστοιχων πρωτεϊνών που επιτυγχάνεται κατά τη χρήση τους, βασίζεται στη δράση του ισχυρού υποκινητή T7 (Dubendorff and Studier, 1991; Hattab et al., 2015). Όταν τα πλασμίδια αυτά βρεθούν σε DE3 κύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα που διαθέτουν στο χρωμοσωμικό τους DNA ένα αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση υπό τον έλεγχο του επαγωγέα *lacUV5*, του οποίου η έκφραση μπορεί να επαχθεί από τη λακτόζη, επιτρέπουν την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με την προσθήκη IPTG.

Καθώς το βακτηριακό στέλεχος SuptoxRNE22 υποστηρίζει το σύστημα έκφρασης DE3, διερευνήθηκε το κατά πόσο είναι δυνατή η επίτευξη αυξημένης παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας και ένα pET πλασμίδιο, πέρα από το pASK75 που φέρει το σύστημα έκφρασης Tet και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα προηγούμενα πειράματα. Μετασχηματίστηκαν, λοιπόν, βακτήρια που παράγουν την αγρίου τύπου RNάση E (ENS134) και *E. coli* SuptoxRNE22 κύτταρα με το πλασμίδιο pET-28(+)-BR2-GFP το οποίο εξέφραζε τη μεμβρανική πρωτεϊνική χίμαιρα BR2-GFP. Στις καλλιέργειες που προέκυψαν μετά το πέρας της διαδικασίας της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης που πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.1

– 0.4 mM IPTG, μετρήθηκαν τα τελικά επίπεδα ανάπτυξης και η τελική συσσώρευση BR2-GFP στις κυτταρικές μεμβράνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται αυξημένη κατά 1.6 φορές παραγωγικότητα ανασυνδυασμένης BR2-GFP σε σχέση με τα κύτταρα που παράγουν την αγρίου τύπου ενδονουκλεάση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η παραγωγή της μεμβρανοπρωτεϊνικής χίμαιρας BR2-GFP στα SuptoxRNE22 κύτταρα από το πλασμίδιο pET παρουσιάζεται σημαντικά αυξημένη, σε σύγκριση με την παραγωγή της στα ίδια κύτταρα από τον πλασμιδιακό φορέα pASK75 που χρησιμοποιεί τον υποκινητή *tet* για την πρωτεϊνική έκφραση (2.7 φορές μεγαλύτερος φθορισμός ίσου όγκου καλλιιεργειών). Συνδυαστικά, λοιπόν, το *E. coli* SuptxRNE22 μπορεί να αποτελέσει έναν οργανισμό-ξενιστή ευρείας εφαρμογής, καθώς επιτυγχάνει σημαντικά ενισχυμένα επίπεδα παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών, ως συμβατό με διαφορετικά πλασμιδιακά συστήματα εξαιρετικά δημοφιλή στη διεθνή επιστημονική κοινότητα (Εικόνα 36).

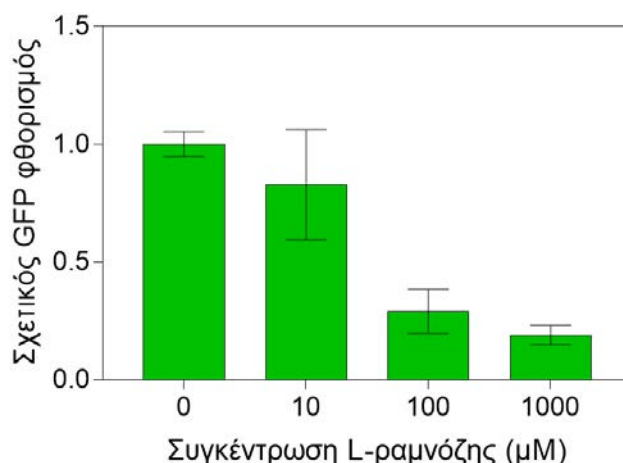


**Εικόνα 36: Τα βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22 μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με διαφορετικά συστήματα πλασμιδίων/υποκινητών:** (Α) Τελική πυκνότητα καλλιεργειών βακτηριακών κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxRNE22 που εκφράζουν την μεμβρανική πρωτεϊνική χίμαιρα BR2-GFP από τους πλασμιδιακούς φορείς pASKBR2-GFP και pET-28a(+)-BR2-GFP. OD600: Οπτική πυκνότητα στα 600 nm. (Β) Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου βακτηριακών καλλιεργειών κυττάρων αγρίου τύπου και SuptoxRNE22 που εκφράζουν την πρωτεΐνη BR2-GFP από τα πλασμίδια pASKBR2-GFP και pET-28a(+)-BR2-GFP. (Γ) GFP φθορισμός μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων από τις ίδιες καλλιέργειες με τα (Α) και (Β), όπως μετρήθηκε με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Οι τιμές που αναφέρονται στο (Α) και στο (Β) αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφάλματος υποδηλώνουν  $\pm$  s.e.m.

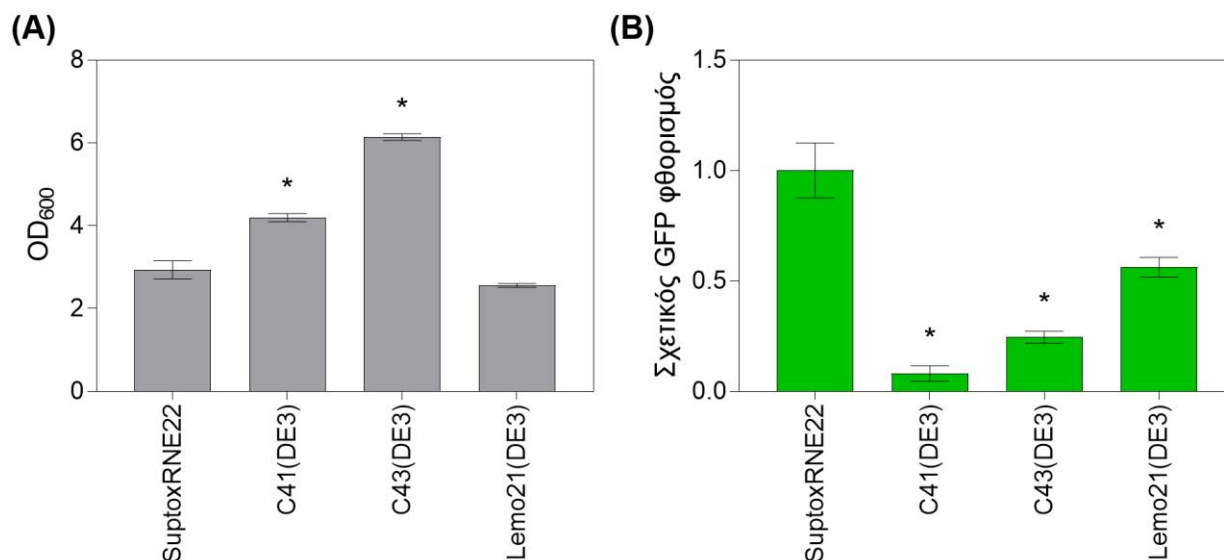
### **3.5. Το στέλεχος *E. coli* SuptoxRNE22 ξεπερνά σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται συχνά για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών**

Τέλος, επιχειρήθηκε η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των SuptoxRNE22 κυττάρων, με τρία από τα πιο δημοφιλή εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την βακτηριακή παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών ή και άλλων τοξικών πρωτεϊνών. Τα βακτηριακά στελέχη που επιλέχθηκαν για σύγκριση με το SuptoxRNE22 ήταν τα C41(DE3) και C43(DE3) (Lucigen) (Miroux and Walker, 1996) καθώς και τα Lemo21(DE3) (New England Biolabs) (Wagner et al., 2008). Λόγω του γεγονότος ότι τα κύτταρα από όλα τα επιλεγμένα στελέχη φέρουν στο χρωμόσωμά τους ένα αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση υπό τον έλεγχο του *lacUV5* υποκινητή (σύστημα DE3), επιλέχθηκε ένα pET πλασμίδιο για την πραγματοποίηση της συγκριτικής υπερέκφρασης μεμβρανικής πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22, C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) μετασχηματίστηκαν με το ίδιο πλασμίδιο pET-28a(+)-

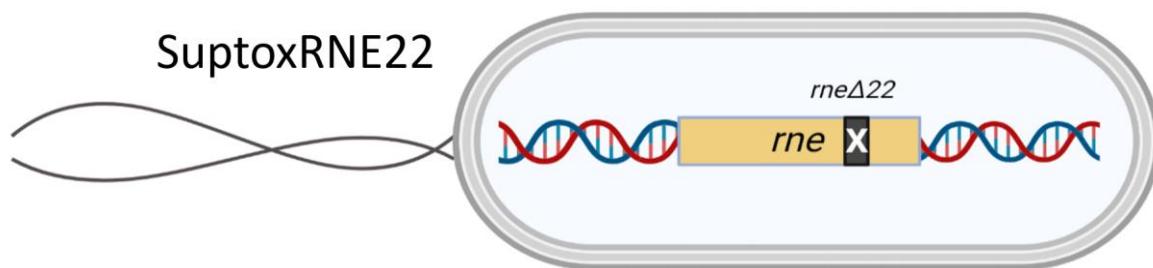
BR2-GFP που κωδικοποιούσε για την πρωτεϊνική χίμαιρα BR2-GFP. Στην περίπτωση των Lemo21(DE3) κυττάρων, προσδιορίστηκε αρχικά ή βέλτιστη συγκέντρωση L-ραμνόζης που μεγιστοποιούσε την παραγωγικότητα της BR2-GFP ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας (**Εικόνα 37**). Μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης της BR2-GFP, υπολογίστηκαν τα τελικά επίπεδα βακτηριακής βιομάζας μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η συσσώρευση ανασυνδυασμένης BR2-GFP στις κυτταρικές μεμβράνες μέσω μέτρησης του φθορισμού κυττάρων που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας. Σε αντιστοιχία με προηγούμενες μελέτες (Wagner et al., 2008; Gialama et al., 2017b), φαίνεται ότι τα βακτηριακά κύτταρα Lemo21(DE3) στα οποία η παραγωγή της T7 RNA πολυμεράσης ρυθμίζεται με βάση τα επίπεδα της L-ραμνόζης που προστίθενται, η παραγωγικότητα σε ανασυνδυασμένη BR2-GFP ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα C41(DE3) και C43(DE3). Επιπλέον, η σύγκριση των SuptoxRNE22 με τα τρία στελέχη C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3), έδειξε ότι τα επίπεδα συσσώρευσης ανασυνδυασμένης μεμβρανοπρωτεΐνης ήταν σημαντικά αυξημένα στα SuptoxRNE22 κύτταρα, σε σχέση με τα τρία εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών (**Εικόνα 38**). Έτσι, τα αποτελέσματα της σύγκρισης που πραγματοποιήθηκε υποδεικνύουν ότι το SuptoxRNE22 είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό βακτηριακό στέλεχος και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως οργανισμός-ξενιστής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.



**Εικόνα 37:** Εύρεση των μέγιστων επιπέδων έκφρασης της μεμβρανοπρωτεϊνικής χίμαιρας BR2-GFP από το πλασμίδιο pET-28a(+)-BR2-GFP με βάση την βέλτιστη συγκέντρωση L-ραμνόζης στα βακτηριακά κύτταρα Lemo21(DE3). Σχετικός GFP φθορισμός ίσου όγκου βακτηριακών καλλιεργειών Lemo21(DE3) κυττάρων, που παράγουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET-28a(+)-BR2-GFP, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων L-ραμνόζης (0, 10, 100 και 1000  $\mu$ M L-ραμνόζη). Οι αναγραφόμενες τιμές στα διαγράμματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις και οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m.



**Εικόνα 38:** Τα *E. coli* SuptoxRNE22 κύτταρα ξεπερνούν σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. (A) Τελικά επίπεδα ανάπτυξης καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων SuptoxRNE22, C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) που εκφράζουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET-28a(+)-BR2-GFP όπως υπολογίστηκαν με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD<sub>600</sub>). (B) Σχετικός GFP φθορισμός βακτηριακών κυττάρων SuptoxRNE22, C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) που προέρχονται από ίσο όγκο καλλιέργειας και παράγουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP με προσθήκη 0.1 mM IPTG, και 0  $\mu$ M L-ραμνόζη στα Lemo21(DE3). Οι τιμές που αναγράφονται στα διαγράμματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, κάθε ένα εκ των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$  s.e.m. και το \* υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) σε σύγκριση με το δείγμα SuptoxRNE22.



**Εικόνα 39: Σχηματική απεικόνιση του *E. coli* SuptoxRNE22 στελέχους.** Το στέλεχος αυτό φέρει τη συγκεκριμένη μεταλλαγή *rneΔ22* στο γονίδιο *rne* που κωδικοποιεί την βασική βακτηριακή ενδονουκλεάση RNάση E, διαθέτει μειωμένη ριβονουκλεολυτική ικανότητα, και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων μεμβρανοπρωτεϊνών, καθώς επιτυγχάνει σημαντικά αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης τελικής βιομάζας ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την παραγωγικότητα ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.



## **Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>**

### **Συμπεράσματα – Συζήτηση**

## 4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Στόχος της πειραματικής έρευνας ήταν η κατασκευή μιας σειράς βελτιωμένων *E. coli* στελεχών που θα μπορούν να ανθίστανται στην κυτταροτοξικότητα που προκαλείται συχνά κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε βακτήρια και, ταυτόχρονα, θα ενισχύουν τα επίπεδα συσσώρευσης ενός εύρους ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης στις κυτταρικές μεμβράνες. Η έρευνα αυτή βασίστηκε στο υπάρχον εξειδικευμένο βακτηριακό στέλεχος SuptoxR (Gialama et al., 2017b), το οποίο κατασκευάστηκε στο παρελθόν στο εργαστήριο που υλοποιήθηκε η συγκεκριμένη διδακτορική έρευνα για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, και στη συνέχεια μελετήθηκε περαιτέρω προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες που μεγιστοποιούν την παραγωγικότητά του (Michou et al., 2019). Η λειτουργία του SuptoxR βασίζεται στην υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* του *E. coli*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RraA στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου, η οποία λειτουργεί ως ένας αναστολέας της δράσης της RNάσης E να αποδομεί μόρια mRNA.

Η πρώτη προσέγγιση που ακολουθήθηκε προκειμένου να αναπτυχθούν βακτηριακά στελέχη SuptoxR δεύτερης γενιάς, ήταν η αναζήτηση φυσικών παραλλαγών της RraA του *E. coli*, ανάμεσα σε γονιδιώματα άλλων οργανισμών, και συγκεκριμένα σε πρωτεοβακτήρια και χλωροπλάστες φυτών, στα οποία κωδικοποιούνται ομόλογα *rraA* γονίδια, και η μελέτη τους ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την επαγόμενη από τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση τοξικότητα και να ενισχύουν την παραγωγικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Παρά το γεγονός ότι έχει προσδιοριστεί η δομή της RraA του *E. coli* (PDB 1Q5X) (Monzingo et al., 2003), καθώς και μερικών ακόμα ομόλογων RraA πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα από τους οργανισμούς *Mycobacterium tuberculosis* (Johnston et al., 2003), *Thermus thermophilis* (PDB 1J3L) (Rehse et al., 2004) και *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3C8O) (Tang et al., 2010), οι πληροφορίες από τη βιβλιογραφία δεν επαρκούν για να την κατανόηση της σχέσης της

πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής της με τη λειτουργία της. Συνεπώς, το κριτήριο επιλογής ομόλογων RraA πρωτεϊνών στην παρούσα έρευνα ήταν αποκλειστικά το ποσοστό ομολογίας της αμινοξικής τους ακολουθίας σε σχέση με την εγγενή RraA του *E. coli*. Η συνέκφραση των επιλεγμένων *rraA* γονιδίων με μεμβρανικές πρωτεΐνες ευκαρυωτικής και προκαρυωτικής προέλευσης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι εκτός από την RraA του *E. coli*, υπάρχουν και άλλες ομόλογες RraA πρωτεΐνες, οι οποίες είναι επίσης αποτελεσματικές στην καταπολέμηση της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας και στην ενίσχυση της απόδοσης παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Επιπλέον και σημαντικότερα, εντοπίστηκαν δύο RraA πρωτεΐνες, από τους οργανισμούς *P. mirabilis* και *P. stuartii*, οι οποίες ήταν ακόμη πιο αποτελεσματικές σε σύγκριση με την RraA του *E. coli*, και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή δύο νέων βακτηριακών στελεχών δεύτερης γενιάς, που ονομάστηκαν SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, των οποίων οι αποδόσεις ξεπερνούν το στέλεχος πρώτης γενιάς SuptoxR.

Η RraA ανακαλύφθηκε το 2003 ως μια πρωτεΐνη με την ικανότητα να προσδένεται στην βασική ενδονουκλεάση του *E. coli*, την RNάση E, και να αναστέλλει τη δράση της να αποδομεί μόρια mRNA (Lee et al., 2003). Μελέτες αλληλεπιδράσεων των επιφανειών και φασματομετρίας μάζας έδειξαν ότι η RraA μπορεί να δημιουργήσει πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις σε ανεξάρτητα τμήματα της RNάσης E και του RNA αποικοδομοσώματος, και συγκεκριμένα έχουν βρεθεί δύο σημεία πρόσδεσής της στην C-τελική περιοχή της ενδονουκλεάσης που έχουν προσδιοριστεί ως σημεία πρόσδεσης RNA, καθώς και άλλο ένα επιπλέον σημείο αλληλεπίδρασης με την C-τελική περιοχή της RNA ελικάσης που συμμετέχει στο σχηματισμό του αποικοδομοσώματος, της RhlB (Gorna et al., 2010). Η κρυσταλλική δομή της RraA έδειξε ότι σχηματίζει ομοτριμερή που διαθέτουν ηλεκτρωνητικές αυλακώσεις εκτεθειμένες στην εξωτερική επιφάνεια, τα οποία προσδένονται σε μια από τις τρεις θέσεις πρόσδεσης της RNάσης E και του RNA αποικοδομοσώματος, ενώ φαίνεται επιπλέον πως σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης

μπορούν και διμερίζονται σχηματίζοντας έτσι ένα λειτουργικό εξαμερές, το οποίο ενδεχομένως προσδένεται ταυτόχρονα σε δύο θέσεις που εντοπίζονται είτε σε ένα είτε σε δύο γειτονικά μόρια RNάσης E (Monzingo et al., 2003). Ο τρόπος όμως με τον οποίο η RraA επηρεάζει τελικά τη δράση της RNάσης E δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, καθώς είναι πιθανό να παρεμποδίζει με τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί την πρόσδεση μορίων RNA στην RNάση E και στο αποικοδομώσωμα, ενώ ταυτόχρονα έχει αποδειχθεί ότι δεν αλληλεπιδρά απευθείας με μόρια mRNA (Gorna et al., 2010).

Η υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* στο *E. coli*, επηρεάζει τα επίπεδα περισσότερων από 2000 διαφορετικών mRNA, ένα σημαντικό ποσοστό εκ των οποίων έχει βρεθεί ότι κωδικοποιεί πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου και τον αναερόβιο μεταβολισμό (Lee et al., 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η διαταραχή της ακεραιότητας του κυτταρικού φακέλου και ο σχηματισμός συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, έχουν εντοπιστεί ως βασικές συνέπειες της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli* (Wagner et al., 2007). Σε προηγούμενη έρευνα, έχει αποδειχθεί ότι οι ευεργετικές συνέπειες της πρωτεΐνης RraA στην υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών διενεργούνται μέσω της δράσης της RNάσης E (Gialama et al., 2017a). Εκτός από την RraA, στο γονιδίωμα του *E. coli* κωδικοποιείται μια δεύτερη πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τα επίπεδα δραστηριότητας της RNάσης E, η RraB (regulator of RNase E activity B) (Gao et al., 2006). Το τμήμα του μεταγραφώματος που επηρεάζεται από την RraB είναι κατά κύριο λόγο διακριτό σε σχέση με αυτό που επηρεάζεται από την RraA, αλλά και μερικώς επικαλυπτόμενο, καθώς υπάρχουν και μερικά mRNA των οποίων τα επίπεδα έχει βρεθεί ότι μπορούν να τροποποιηθούν από την δράση και των δύο ρυθμιστικών παραγόντων (Gao et al., 2006). Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης της RraA, κατά την συνέκφραση του γονιδίου *rraB*, δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση των επιπέδων συσσώρευσης τελικής βιομάζας και ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, παρά το γεγονός

ότι η RraB παράχθηκε επαρκώς (Gialama et al., 2017a). Με βάση αυτά τα δεδομένα διατυπώθηκε η υπόθεση ότι η RraA καταστέλλει την τοξικότητα που επάγεται κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και ενισχύει τη συσσώρευση μεμβρανοπρωτεϊνών με έμμεσο τρόπο, ο οποίος εμπεριέχει τη σταθεροποίηση ενός εύρους mRNA και την επακόλουθη αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης συγκεκριμένων παραγόντων που προωθούν την παραγωγικότητα μεμβρανικών πρωτεϊνών, και οι οποίοι πιθανώς εμπλέκονται στην κυτταρική διεργασία της βιοσύνθεσης του κυτταρικού φακέλου ή και στον αναερόβιο μεταβολισμό. Επιπλέον, η υπόθεση προσανατολίζεται στην ύπαρξη πολλών παραγόντων που δρουν συνεργιστικά και όχι μιας μεμονωμένης πρωτεΐνης, δεδομένου ότι στη δεύτερη περίπτωση η πρωτεΐνη αυτή θα είχε πιθανότητα εντοπιστεί στην αρχική γενετική σάρωση που πραγματοποιήθηκε με στόχο την εύρεση καταστολέων της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας κατά την υπερέκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, η οποία ανέδειξε τα δύο αρχικά γονίδια-συμπαράγοντες ενίσχυσης της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, *rfaA* και *djlA* (Gialama et al., 2017b).

Όπως αναφέρθηκε, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η RraA αλληλεπιδρά με την RNάση E δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Συνεπώς, είναι εξαιρετικά δύσκολο να προβλεφθεί σε κάθε περίπτωση ο τρόπος με τον οποίο θα επιδράσει κάθε διαφορετική φυσική παραλλαγή της RraA που σχηματίζεται από διαφορετική αμινοξική ακολουθία, στην αναστολή της δραστηριότητας της εγγενούς RNάσης E του *E. coli*, και κατά συνέπεια το πως θα τροποποιηθεί σε κάθε περίπτωση το μεταγραφικό προφίλ του βακτηρίου κατά την υπερέκφραση των διαφορετικών παραλλαγών της RraA που μελετήθηκαν. Έτσι, μπορεί μόνο να διατυπωθεί η υπόθεση είναι ότι οι διαφορετικές παραλλαγές της RraA που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, όταν υπερεκφράζονται και παράγονται σε σημαντικά επίπεδα, αλληλεπιδρούν με την εγγενή RNάση E του *E. coli* με έναν ελαφρώς διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση, και επομένως οδηγούν σε ελαφρώς τροποποιημένο μεταγράφομα, όπου διαφοροποιούνται τελικά τα επίπεδα

συσσώρευσης των παραγόντων που αναφέρθηκαν ότι πιθανώς βοηθούν την διαδικασία της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επιπλέον, το γεγονός ότι για κάθε μεμβρανική πρωτεΐνη που μελετήθηκε, εντοπίστηκαν διαφορετικές παραλλαγές της RraA που επιφέρουν τα βέλτιστα αποτελέσματα, υποδεικνύει πιθανώς την ύπαρξη μιας λεπτής ισορροπίας μεταξύ των βέλτιστων επιπέδων των διαφορετικών συμπαραγόντων (διαφορετικές παραλλαγές της RraA) και της επίτευξης της μέγιστης παραγωγικότητας για κάθε ανασυνδυασμένη μεμβρανική πρωτεΐνη.

Η δεύτερη προσέγγιση που ακολουθήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας για την ανάπτυξη βελτιωμένων βακτηριακών στελεχών για την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών σε υψηλές αποδόσεις, βασίζεται και πάλι στο αρχικό στέλεχος SuptoxR (Gialama et al., 2017b), αλλά προσεγγίστηκε με έναν διαφορετικό τρόπο, όπου τα επίπεδα δραστηριότητας της RNάσης E αντί να τροποποιούνται έμμεσα μέσω υπερέκφρασης ενός μορίου-αναστολέα, επηρεάζονται άμεσα μέσω χρωμοσωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *rne* που κωδικοποιεί τη βακτηριακή ενδονουκλεάση. Σε αυτή την κατεύθυνση, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών σε μια σειρά από βακτηριακά στελέχη που φέρουν γενετικές απαλοιφές στο γονίδιο *rne* και παρουσιάζουν μειωμένη ριβονουκλεολυτική ικανότητα σε σχέση αυτή της αγρίου τύπου RNάσης E ενώ ταυτόχρονα οι μεταλλάξεις αυτές επιτρέπουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων που τις παράγουν. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το κατά πόσο παρατηρείται καταστολή της κυτταροτοξικότητας που επάγεται από την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και αύξηση των επιπέδων συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, με τρόπο που προσομοιάζει τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* στο βακτηριακό στέλεχος SuptoxR. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι τα *E. coli* στελέχη που φέρουν τις γενετικές μεταλλάξεις *rne131*, *rneΔ21* και *rneΔ22* στην C-τελική περιοχή της RNάσης E, μπορούν και καταστέλλουν αποτελεσματικά την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα καθώς επιτυγχάνουν σημαντικά αυξημένα

επίπεδα συσσώρευσης τελικής βιομάζας και ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών στη βακτηριακή μεμβράνη. Από τα βακτηριακά κύτταρα των τριών στελεχών, βρέθηκε ότι αυτά που έφεραν τη συγκεκριμένη γενετική απαλοιφή *rneΔ22*, ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην καταστολή της τοξικότητας που προκαλεί συχνά η υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και ταυτόχρονα ενίσχυσαν σημαντικά τα επίπεδα παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών ευκαρυωτικής και προκαρυωτικής προέλευσης. Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, και σε αναλογία με την ονοματολογία του αρχικού SuptoxR στελέχους, το στέλεχος που φέρει τη χρωμοσωμική μετάλλαξη *rneΔ22* ονομάστηκε SuptoxRNE22 (Suppressor of toxicity – deletion 22 in RNase E). Η χρήση των *E. coli* κυττάρων SuptoxRNE22 βρέθηκε επιπλέον ότι είναι συμβατή με διαφορετικά πλασμίδια και εκκινητές, που χρησιμοποιούνται συχνά κατά τη βακτηριακή υπερέκφραση υδατοδιαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ακόμη, μέσα από μια πειραματική διαδικασία σύγκρισης του SuptoxRNE22 στελέχους με τα υπάρχοντα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, βρέθηκε ότι τα SuptoxRNE22 κύτταρα είναι πιο αποδοτικά.

Όπως αναφέρθηκε, σε προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η ευεργετική επίδραση της υπερέκφρασης της RraA στη διαδικασία υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού που εμπεριέχει την δράση της RNάσης E, ενώ επιπλέον είχε βρεθεί ότι δεν συμπεριλαμβάνει την RNάση G (Gialama et al., 2017a). Η N-τελική, καταλυτική περιοχή της RNάσης G παρουσιάζει μεγάλη ομολογία ως προς την αμινοξική της ακολουθία σε σχέση με την καταλυτική περιοχή της RNάσης E, αλλά αντίθετα η C-τελική της περιοχή δεν περιλαμβάνει καθόλου ρυθμιστικές υπό-περιοχές παρόμοιες με αυτές που εντοπίζονται στην RNάσης E (Lee et al., 2002). Επιπλέον, στην αρχική έρευνα στην οποία περιγράφεται η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους SuptoxR, διερευνήθηκε το κατά πόσο η υπερέκφραση του *rraA* γονιδίου, που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του αναστολέα της δράσης

της RNάσης E να αποδομεί μόρια mRNA, επηρεάζει τελικά τα επίπεδα του συγκεκριμένου mRNA που κωδικοποιεί την μεμβρανική πρωτεΐνη-στόχο και σύμφωνα με πειράματα ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR), βρέθηκε δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή (Gialama et al., 2017b). Έτσι αποκλείεται το ενδεχόμενο της αύξησης της παραγωγικότητας ανασυνδυασμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης να προκύπτει λόγω σταθεροποίησης του mRNA που την παράγει. Αποκλείεται όμως και το ενδεχόμενο ο μηχανισμός της παρατηρούμενης καταστολής της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας και της ενισχυμένης παραγωγικότητας μεμβρανικών πρωτεϊνών, να εμπεριέχει μια μειωμένη και πιο ισορροπημένη έκφραση του mRNA της μεμβρανοπρωτεΐνης-στόχου. Η πιθανή μείωση του συγκεκριμένου mRNA θα μπορούσε να αποτρέπει την κατάρρευση του πρωτεοσυνθετικού μηχανισμού του βακτηρίου, όπως συμβαίνει στα εμπορικά διαθέσιμα *E. coli* στελέχη C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) που χρησιμοποιούνται συχνά για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπου τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου ρυθμίζονται ή μειώνονται (Miroux and Walker, 1996; Wagner et al., 2008; Kwon et al., 2015; Schlegel et al., 2015).

Η RNάση E είναι ένα απαραίτητο για την επιβίωση του βακτηρίου ένζυμο, το οποίο αποτελεί τη βασική ενδονουκλεάση που αποδομεί μόρια mRNA στο εσωτερικό του *E. coli*, και της οποίας οι λειτουργία επηρεάζει ένα ιδιαίτερα μεγάλο εύρος μεταγράφων, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχει στην επεξεργασία πρόδρομων μορίων δομικών RNA, όπως για παράδειγμα μόρια ριβοσωμικού (ribosomal RNA) και μεταφορικού RNA (transfer RNA) (Carpousis et al., 2009). Καθώς *E. coli* στελέχη που φέρουν συγκεκριμένες γενετικές απαλοιφές του γονιδίου *rne*, οι οποίες οδηγούν σε μειωμένη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της RNάσης E, παρουσιάζουν παρόμοιες επιδόσεις σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν στο αρχικό βακτηριακό στέλεχος στο οποίο υπερεκφράζεται το γονίδιο *rraA*, είναι πιθανό οι ευεργετικές ιδιότητες που παρατηρούνται στο SuptoxRNE22 ως προς την καταστολή της επαγόμενης από τη μεμβρανοπρωτεϊνική

υπερέκφραση τοξικότητας και ως προς την ενίσχυση των επιπέδων συσσώρευσης ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, να δημιουργούνται μέσω του ίδιου μηχανισμού με αυτόν της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης RraA στο στέλεχος SuptoxR. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον επίσης το γεγονός ότι οι γενετικές απαλοιφές της RNάσης E οι οποίες οδηγούν στην αύξηση των τελικών επιπέδων ανάπτυξης της καλλιέργειας και συσσώρευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, είναι εξαιρετικά εξειδικευμένες, καθώς διαπιστώθηκε ότι βακτηριακά στελέχη με πολύ παρόμοιες μεταλλάξεις, των οποίων οι ακολουθίες διαφέρουν μόνο σε πολύ λίγα αμινοξικά κατάλοιπα, παρουσίασαν μεγάλες διαφορές στην απόδοσή τους.

Μεταξύ των στελεχών που έφεραν γενετικές απαλοιφές του γονιδίου *rne* και μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα, το στέλεχος ENS134-2, το οποίο εκφράζει την παραλλαγή Rne131 της RNάσης E, από την οποία έχει διαγραφεί όλη η C-τελική περιοχή, βρέθηκε ότι είναι επίσης αποτελεσματικό στην ενίσχυση της παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το στέλεχος αυτό είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμο και κυκλοφορεί στην αγορά από την εταιρία Thermo Fisher Scientific με την ονομασία BL21 Star(DE3). Τα BL21 Star(DE3) κύτταρα επιτυγχάνουν αυξημένες αποδόσεις παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, πιθανώς λόγω μείωσης της ριβονουκλεολυτικής ικανότητάς τους και αύξησης της σταθεροποίησης του mRNA της πρωτεΐνης-στόχου, ενώ η χρήση τους προτείνεται από τον κατασκευαστή για υψηλού επιπέδου έκφραση μη τοξικών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Lopez et al., 1999). Στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας, στα βακτηριακά στελέχη που έφεραν γενετικές απαλοιφές της RNάσης E, μελετήθηκε η υπερέκφραση γονιδίων που εξέφραζαν ευκαρυωτικές μεμβρανικές πρωτεΐνες (BR2 και CLRN1) οι οποίες παρουσιάζουν συνήθως υψηλή τοξικότητα κατά την έκφρασή τους στο βακτήριο, αλλά και προκαρυωτικές (MscL και HtdR). Το βακτηριακό στέλεχος που κωδικοποιεί την παραλλαγή Rne131 της RNάσης E (BL21 Star(DE3)) αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε σύγκριση με το στέλεχος που εκφράζει την αγρίου τύπου RNάση E, κατά την υπερέκφραση των προκαρυωτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, αλλά λίγο έως καθόλου

αποτελεσματικό στην περίπτωση που υπερεκφράζονταν οι ανθρώπινες ευκαρυωτικές μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αντίθετα, το *E. coli* στέλεχος SuptoxRNE22 ενίσχυσε σημαντικά την παραγωγή ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας, όλων των ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που δοκιμάστηκαν.

Η τελευταία παρατήρηση θα μπορούσε να θεωρηθεί μη αναμενόμενη σε πρώτη ανάγνωση, καθώς οι δύο παραλλαγές της RNάσης E (Rne131 και RneΔ22), που εκφράζονται από τα δύο βακτηριακά στελέχη BL21 Star(DE3) και SuptoxRNE22, αντίστοιχα, έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν την ενδονουκλεάση με παρόμοιο τρόπο μειώνοντας σε παραπλήσιο βαθμό τα τελικά επίπεδα δραστηριότητάς της, παρά το γεγονός ότι η μεταλλαγή *rne131* κωδικοποιεί μια παραλλαγή της RNάσης E από την οποία απουσιάζει ολόκληρη η C-τελική περιοχή (Leroy et al., 2002). Τα αποτελέσματα αυτά διαμορφώνουν την υπόθεση ότι ενώ η μείωση της δραστηριότητας της RNάσης E και η επερχόμενη σταθεροποίηση του τμήματος του μεταγραφώματος του κυττάρου που επηρεάζεται από τη λειτουργία της, έχουν ευεργετική επίδραση στην διαδικασία υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών, ταυτόχρονα, η διατήρηση συγκεκριμένων τμημάτων της C-τελικής περιοχής, στις οποίες πραγματοποιούνται επιπρόσθετες ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, είναι πιθανό να ενισχύει τη διαδικασία σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό. Για παράδειγμα στην παραλλαγή RneΔ22 της RNάσης E που εκφράζεται στο *E. coli* στέλεχος SuptoxRNE22, διατηρούνται ανέπαφες οι υποπεριοχές της ακολουθίας της C-τελικής περιοχής που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με όλες τις γνωστές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το RNA αποικοδομόσωμα, δηλαδή τις πρωτεΐνες RhlB, ενολάση και PNPάση (**Εικόνα 30**), ενώ στην παραλλαγή Rne131 που εκφράζεται στο *E. coli* στέλεχος BL21 Star(DE3), απουσιάζει ολόκληρη η C-τελική περιοχή, και επομένως, δεν υπάρχει η δυνατότητα αλληλεπίδρασης της ενδονουκλεάσης με τους πρωτεϊνικούς παράγοντες που επηρεάζουν καθολικά τα επίπεδα συσσώρευσης mRNA στο *E. coli*. Λόγω του γεγονότος ότι η RNάση E και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο που δημιουργεί, το RNA αποικοδομόσωμα,

επηρεάζουν τα επίπεδα μιας πληθώρας mRNA στο εσωτερικό του κυττάρου, είναι αδύνατο να προβλεφθεί ο τρόπος με τον οποίο θα μεταβληθεί το μεταγράφομα του βακτηρίου-ξενιστή, κατά την έκφραση των διαφορετικών παραλλαγών της RNάσης E και της υπερέκφρασης ανασυνδυασμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις και της λογικής που αναπτύχθηκε παραπάνω, διατυπώνεται η υπόθεση ότι οι διαφορετικές γενετικές απαλοιφές στην C-τελική περιοχή της RNάσης E που εκφράζονται στα διαφορετικά ENS134-X στελέχη, επηρεάζουν διαφορετικές ομάδες mRNA ή επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό τα τελικά επίπεδα συσσώρευσής τους. Η εξειδικευμένη αυτή σταθεροποίηση του μεταγραφώματος που προκύπτει σε κάθε περίπτωση, και η αύξηση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων κυτταρικών παραγόντων είναι πιθανώς το κλειδί για την ενίσχυση της παραγωγικότητας ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που παρουσιάζεται σε συνθήκες άμεσης ή έμμεσης μείωσης της δραστηριότητας της RNάσης E.

Πρόσφατα, μέσα από μια ανεξάρτητη γενετική σάρωση που πραγματοποιήθηκε από τους Heyde και Nørholm για την αναζήτηση γενετικών τροποποιήσεων που βελτιώνουν τα επίπεδα παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στο *E. coli*, εντοπίστηκαν επίσης παραλλαγές του γονιδιώματος που επιφέρουν μείωση στη δραστηριότητα της RNάσης E (Heyde and Norholm, 2021). Σε αυτή την έρευνα, εντοπίστηκε η ένθεση ενός μεταθετού στοιχείου στο γονίδιο *rne*, η οποία προκαλεί μια διαγραφή στη C-τελική περιοχή της RNάσης E, γεγονός που οδηγεί τελικά σε σημαντική αύξηση της παραγωγικότητας ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών των βακτηριακών κυττάρων. Η παραλλαγή αυτή μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με την Rne131 που εκφράζεται στο στέλεχος BL21 Star(DE3), αφού λείπει επίσης το μεγαλύτερο τμήμα της C-τελικής της περιοχής της ενδονουκλεάσης, αλλά ταυτόχρονα διαφέρει μερικώς, καθώς εμπεριέχει τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-702, αντί των αμινοξέων 1-584 που κωδικοποιούνται από την γενετική μεταλλαγή *rne131* του BL21 Star(DE3). Ο Nørholm και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι το *E. coli* στέλεχος που κωδικοποιεί την παραλλαγή της RNάσης E

που φέρει 702 αμινοξικά κατάλοιπα, η οποία ονομάστηκε Evo21(DE3), επιτυγχάνει σημαντικά ενισχυμένα επίπεδα παραγωγής ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, και μάλιστα μπορεί να ξεπεράσει σε απόδοση τα βακτηριακά κύτταρα του στελέχους BL21 Star(DE3) (Heyde and Norholm, 2021). Επιπλέον, σημειώνεται η τυχαία ανακάλυψη της μεταλλαγής D346N στην N-τελική περιοχή της RNάσης E, η οποία επίσης οδήγησε σε αυξημένη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα του ενζύμου, και της οποίας η υπερέκφραση από τον πλασμιδιακό φορέα pLysS-Max αύξησε την παραγωγικότητα μεμβρανικών πρωτεϊνών σε επίπεδα ακόμη υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά που επιτεύχθηκαν κατά την έκφραση της παραλλαγής των 702 αμινοξικών καταλοίπων στο Evo21(DE3) στέλεχος (Heyde and Norholm, 2021).

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του συνόλου των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Gialama et al., 2017a; Gialama et al., 2017b; Heyde and Norholm, 2021), αλλά και αυτών που παρουσιάζονται στην παρούσα διδακτορική έρευνα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στο *E. coli* μπορεί να ενισχυθεί σε μεγάλο βαθμό από την συνολική τροποποίηση των επιπέδων συσσώρευσης των διαφορετικών mRNA μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή, η οποία θα έχει πραγματοποιηθεί με εξαιρετικά εξειδικευμένους τρόπους. Η κατάλληλη ρύθμιση της δραστηριότητας της RNάσης E μπορεί να επιτευχθεί είτε άμεσα, για παράδειγμα με γενετικές απαλοιφές συγκεκριμένων περιοχών της ενδονουκλεάσης ή με την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις των βακτηριακών στελεχών BL21 Star(DE3), Evo21(DE3) και SuptoxRNE22 (Leroy et al., 2002; Heyde and Norholm, 2021), είτε έμμεσα, για παράδειγμα κατά τη συνέκφραση παραγόντων που παρεμβαίνουν στα επίπεδα δραστηριότητας της RNάσης E, όπως η πρωτεΐνη RraA που αναστέλλει την αποδομητική δράση της RNάσης E, και υπερεκφράζεται στο στέλεχος SuptoxR (Gialama et al., 2017b) καθώς και στα βελτιωμένα βακτηριακά στελέχη δεύτερης γενιάς SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 (Vasilopoulou et al., 2022). Συνολικά τα

αποτελέσματα της έρευνας υποστηρίζουν την ιδέα ότι η ρύθμιση της δραστικότητας της βασικής ενδονουκλεάσης του *E. coli*, να αποδομεί μόρια mRNA με συγκεκριμένο τρόπο, έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του συνολικού μεταγραφώματος του βακτηρίου-ξενιστή, στο οποίο αυξάνεται τελικά η συσσώρευση συγκεκριμένων κυτταρικών παραγόντων που λειτουργούν βοηθητικά ενισχύοντας τη διαδικασία παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Έτσι, τα βακτηριακά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση στις δυσμενείς επιπτώσεις που επιφέρει η διαταραχή η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνεται η ικανότητα παραγωγής αυτών των δύσκολων πρωτεϊνικών στόχων.

Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών SuptoxR πρώτης γενιάς και SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 δεύτερης γενιάς, καθώς και των SuptoxRNE22, παρατηρήθηκε ότι τα αποτελέσματα υπερέκφρασης διαφορετικών μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να διαφέρουν, αλλά σε κάθε περίπτωση παρουσιάζονται αυξημένα σε σχέση με τα αγρίου τύπου στελέχη. Φαίνεται, λοιπόν, ότι είναι μάλλον απίθανο να βρεθεί ένα καθολικό εργαλείο που θα επιφέρει τα βέλτιστα επίπεδα παραγωγικότητας σε κάθε περίπτωση. Ωστόσο, μέσα από την έρευνα που διεξήχθη, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η άμεση ή έμμεση, συγκεκριμένη ρύθμιση της δραστικότητας της RNάσης E, μπορεί να τροποποιήσει με επίσης συγκεκριμένο τρόπο τα επίπεδα mRNA μορίων στο εσωτερικό του βακτηρίου, και να ενισχυθεί τελικά η ικανότητα των *E. coli* κυττάρων να παράγουν μεγάλες ποσότητες ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, τα βακτηριακά στελέχη SuptoxR2.1, SuptoxR2.2 και SuptoxRNE που αναπτύχθηκαν στην παρούσα έρευνα, είναι δυνατό να αποτελέσουν οργανισμούς-ξενιστές ευρείας εφαρμογής, που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από την επιστημονική κοινότητα για την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών καλής ποιότητας, κατάλληλων για περαιτέρω βιοχημικές και δομικές μελέτες.



## **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>**

### **Τρέχουσες μελέτες και προτάσεις για μελλοντική έρευνα**

## 5. Τρέχουσες μελέτες και προτάσεις για μελλοντική έρευνα

### 5.1. Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται αυξημένη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση κατά την μείωση της δραστηριότητας της RNάσης E

Το σύνολο των αποτελεσμάτων της παρούσας ερευνητικής εργασίας, σε συνδυασμό με τα συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί σε προηγούμενες έρευνες (Gialama et al., 2017a; Gialama et al., 2017b), έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η εξειδικευμένη ρύθμιση της δράσης της RNάσης E, να αποδομεί μόρια mRNA, έχει καθοριστική σημασία στην ικανότητα των κυττάρων *E. coli* να ανθίστανται στην κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τη διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών και ταυτόχρονα να παράγουν σημαντικά αυξημένες ποσότητες ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Η εξειδικευμένη αυτή ρύθμιση είναι δυνατόν να προκαλείται είτε άμεσα, όπως στην περίπτωση του *E. coli* στελέχους SuptoxRNE22, όπου εκφράζεται μια γενετική απαλοιφή της RNάσης E με μειωμένη ριβονουκλεολυτική ικανότητα, είτε έμμεσα, όπως στην περίπτωση των *E. coli* στελεχών SuptoxR, SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, όπου η δράση της RNάσης E αναστέλλεται λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης RraA από τους οργανισμούς *E. coli*, *P. mirabilis* και *P. stuartii*, αντίστοιχα, η οποία λειτουργεί ως αναστολέας της ριβονουκλεάσης. Η παρόμοια ευεργετική επίδραση που παρατηρήθηκε στη διαδικασία της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης κατά την ελάττωση της δραστηριότητας της RNάσης E στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ελαφρώς τροποποιημένη ρύθμισή της (π.χ. κατά την υπερέκφραση της RraB ή με γενετικές απαλοιφές του *rne* γονιδίου που διαφέρουν μόνο σε λίγα αμινοξικά κατάλοιπα), δεν επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν συγκεκριμένοι κυτταρικοί παράγοντες που επηρεάζονται με ελαφρώς διαφορετικό τρόπο σε κάθε συνθήκη, και έτσι επιτυγχάνονται τα θετικά αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η καταπολέμηση της κυτταροτοξικότητας και η ενίσχυση της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγονται σε διαφορετικές συνθήκες (proteomic analysis). Σκοπός είναι η εύρεση των μεμονωμένων κυτταρικών παραγόντων ή των βιολογικών μονοπατιών που επηρεάζονται σε κάθε συνθήκη, μέσω του εντοπισμού των διαφορετικών πρωτεϊνών που συντίθενται στο εσωτερικό των κυττάρων σε κάθε περίπτωση που μελετήθηκε, καθώς και της σύγκρισης των επιπέδων στα οποία εκφράζεται η κάθε μια από αυτές. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση *E. coli* MC1061 και SuptoxR κυττάρων που υπερεκφράζουν την τοξική ευκαρυωτική μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP ή την λιγότερο τοξική προκαρυωτική μεμβρανοπρωτεΐνη YidC-GFP. Για την πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση αναλύθηκε επίσης το σύνολο των παραγόμενων πρωτεϊνών βακτηριακών κυττάρων που συνεκφράζουν τον δεύτερο αναστολέα της RNάσης E, την πρωτεΐνη RraB, ταυτόχρονα με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν (**Πίνακας 3**)

**Πίνακας 3: Διαφορετικά δείγματα στα οποία αναλύθηκε το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται.** *E. coli* κύτταρα MC1061 μετασχηματίστηκαν σε κάθε μια από τις εννέα διαφορετικές συνθήκες με το πλασμίδιο ή το συνδυασμό των πλασμιδίων που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

| Πλασμίδια |             |   |                               |   |                                |
|-----------|-------------|---|-------------------------------|---|--------------------------------|
| 1         | pBAD33      | 4 | pBAD33<br>pASK75-BR2-GFP      | 7 | pBAD33<br>pASK75-YidC-GFP      |
| 2         | pBAD33-RraA | 5 | pBAD33-RraA<br>pASK75-BR2-GFP | 8 | pBAD33-RraA<br>pASK75-YidC-GFP |
| 3         | pBAD33-RraB | 6 | pBAD33-RraB<br>pASK75-BR2-GFP | 9 | pBAD33-RraB<br>pASK75-YidC-GFP |

Το σύνολο των αποτελεσμάτων που προέρχονται από τις αναλύσεις των πρωτεωμάτων των διαφορετικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε αρχικά συνδυαστικά, με στόχο την κατασκευή ενός χρωματικού χάρτη συσχέτισης (heat map), στον οποίο απεικονίζεται το κατά πόσο η παραγωγή κάθε πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε παρουσιάζεται αυξημένη (κόκκινο χρώμα) ή μειωμένη (πράσινο χρώμα) σε σχέση με το μέσο όρο της παραγωγικότητας που υπολογίστηκε από το σύνολο των δειγμάτων. Στον συνολικό αυτό χάρτη, γίνεται εμφανής ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο αρχικά ξεχωριστές ομάδες σύμφωνα με την ομοιότητα των επιπέδων έκφρασης κάθε πρωτεΐνης. Στα δείγματα στα οποία έχει επαχθεί η έκφραση της ευκαρυωτικής μεμβρανοπρωτεΐνης BR2-GFP, τροποποιείται αρκετά το πρωτεομικό προφίλ σε σχέση με αυτά στα οποία είτε δεν εκφράζεται κάποια μεμβρανοπρωτεΐνη, είτε εκφράζεται η προκαρυωτική YidC-GFP (**Εικόνα 40**). Η διαφοροποίηση αυτή αντικατοπτρίζει τη σημαντική αλλαγή που προκαλείται κατά την έκφραση της ευκαρυωτικής πρωτεΐνης BR2.

Αρχικά, σύμφωνα με τον χρωματικό χάρτη που σχηματίζεται φαίνεται ότι κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *rraB* δεν τροποποιείται σημαντικά το πρωτεομικό προφίλ, σε σύγκριση με το προφίλ των αντίστοιχων δειγμάτων στα οποία δεν εκφράζεται κάποιος από τους συμπαραγόντες (πλασμίδιο pBAD33) (**Εικόνα 40**). Η τάση αυτή παρατηρείται και μεταξύ των δειγμάτων στα οποία υπερεκφράζεται η BR2-GFP χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση ενός εκ των γονιδίων *rraA* και *rraB*, όπου το δείγμα στο οποίο συνεκφράζονται οι πρωτεΐνες RraA και BR2-GFP, διαφοροποιείται σε σχέση με τα άλλα δύο, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ τους.

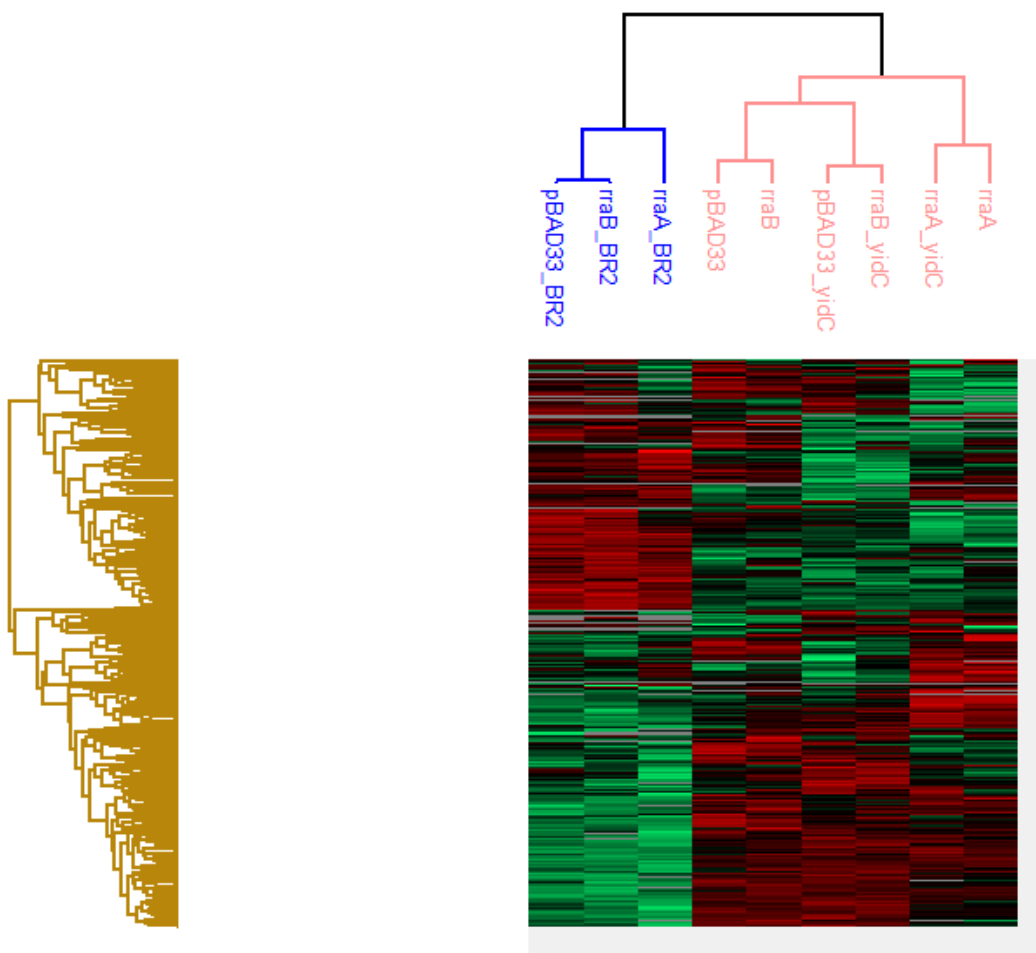
Σύμφωνα με αυτή τη γενική εικόνα, πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια πιο ειδικές αναλύσεις των διαφορών που παρατηρούνται μεταξύ των πρωτεϊνών συγκεκριμένων δειγμάτων. Μετά από σύγκριση των δειγμάτων στα οποία εκφράζεται η BR2-GFP χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση του γονιδίου *rraA*, βρέθηκε ότι έχει ενισχυθεί η έκφραση πρωτεϊνών που συνδέονται, μεταξύ άλλων, με την αντίδραση στο στρες (heat shock proteins) (π.χ. οι πρωτεΐνες

που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *rpoH*, *marR*, *hslR*, *dnaK*, *hslU*, *hflC*, *dnaJ*, *clpB*, *ibpA*, *rpoD*, *ibpB*, *hflX*, *htpG*, *degP* και *hslV*), με τον καταβολισμό πρωτεϊνών (π.χ. οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *hslV* και *ftsH*), με την σταθεροποίηση, την αναδίπλωση και τον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών (π.χ. οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *spry*, *infB*, *degP*, *dsbC*) ή την επεξεργασία μορίων rRNA και ncRNA (π.χ. οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *rbfA*, *rlmE*, *rne*, *rsmJ*) (Πίνακας 4, Εικόνα 42). Ταυτόχρονα φαίνεται να παράγονται σε μικρότερες ποσότητες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια βιοσύνθεσης αρωματικών και άλλων αμινοξέων (π.χ. L-σερίνη, λυσίνη, γλυκίνη, ασπαραγίνη) και σε μεταβολικές διεργασίες, όπως αυτές των μονο-ανθρακικών μορίων, του φολικού οξέος ή της γλυκόζης (Πίνακας 5).

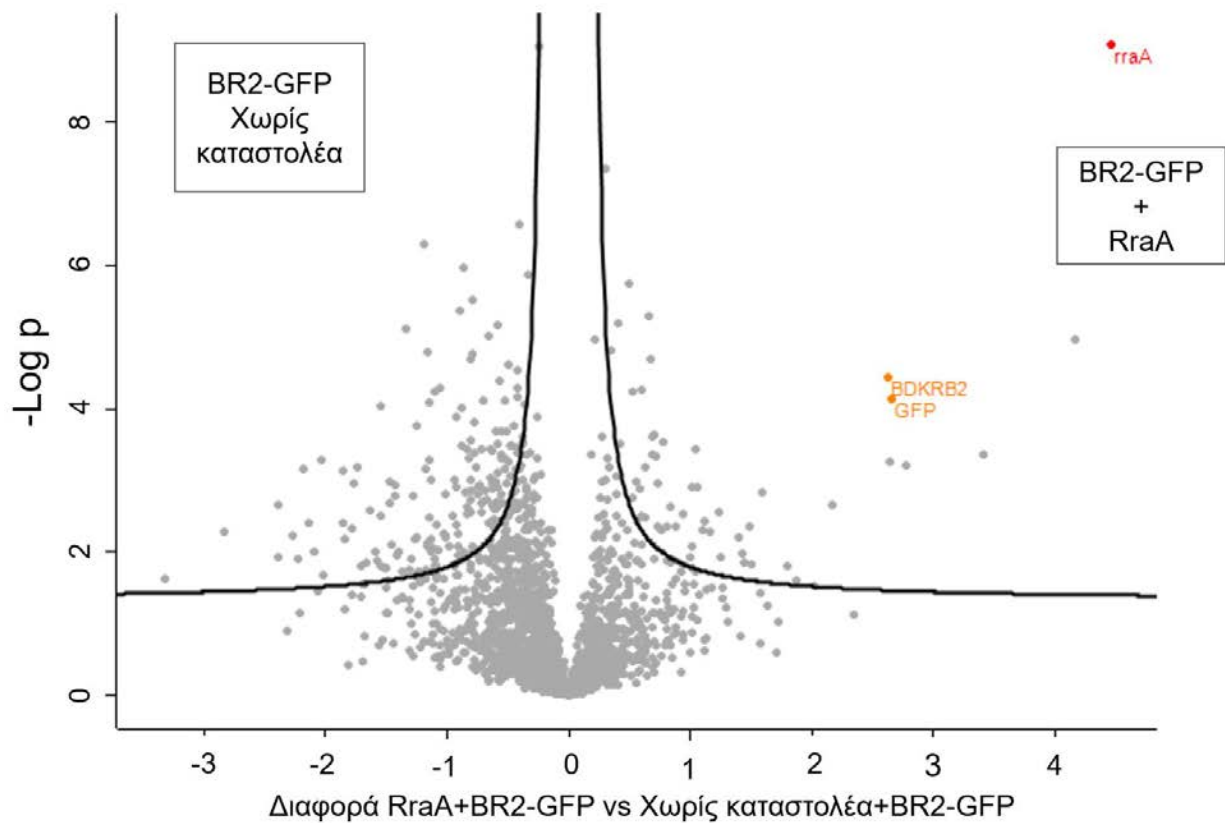
Η αυξημένη παραγωγικότητα ανασυνδυασμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2 στα *E. coli* SuptoxR κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα στα οποία δεν συνεκφράζεται η RraA, ανιχνεύθηκε και μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης. Σύμφωνα με τα δεδομένα για τα κυτταρικά μονοπάτια που επηρεάζονται επίσης κατά τη συνέκφραση της RraA με την BR2, θα μπορούσε να εξαχθεί η υπόθεση ότι κατά την υπερέκφραση της RraA, μειώνεται η δραστηριότητα της RNάσης E να αποδομεί μόρια mRNA, και ενισχύεται η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της υπερέκφρασης της τοξικής μεμβρανοπρωτεΐνης BR2 με διαφορετικούς τρόπους. Αρχικά, απαλύνονται οι επιπτώσεις του στρες που προκαλείται κατά τη διαδικασία της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, μέσω της αυξημένης παραγωγής των σχετικών κυτταρικών παραγόντων. Επιπλέον, καθώς η BR2 δεν εκφράζεται φυσιολογικά στο βακτήριο και συνεπώς δεν αναδιπλώνεται μέσα από ένα προδιαγεγραμμένο μονοπάτι, η παραγωγή της είναι πιθανό να επιβαρύνει το κύτταρο οδηγώντας σε φαινόμενα τοξικότητας. Η αυξημένη παραγωγή παραγόντων που βοηθούν την αναδίπλωση και τον καταβολισμό πρωτεϊνών που παρατηρείται στα SuptoxR κύτταρα, λειτουργεί ενδεχομένως ευεργετικά καταπολεμώντας την τοξικότητα αυτή. Παράλληλα, η αύξηση του καταβολισμού μορίων δομικού RNA και η

μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα σε συγκεκριμένα μονοπάτια που παρατηρείται κατά την υπερέκφραση της RraA, ενδεχομένως σχετίζεται με την διατήρησης δομικών παραγόντων και διοχέτευση αυτών σε άλλες κατευθύνσεις που εν τέλει βοηθούν την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Η σύγκριση των πρωτεϊνικών προφίλ των δειγμάτων στα οποία υπερεκφράζεται η προκαρυωτική μεμβρανική πρωτεΐνη YidC-GFP, χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση της RraA, έδειξε ότι εντοπίζεται ενισχυμένη παραγωγικότητα πρωτεϊνών που εμπλέκονται, μεταξύ άλλων, στο μονοπάτι βιοσύνθεσης ATP (π.χ. οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *atpH*, *atpA*, *atpE*, *atpD*, *atpC*, *atpF*, *atpG*), στην αντίδραση στο κρύο (π.χ. οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *cspA*, *rbfA*, *cspG*, *infC*, *lepA*, *infB*, *rnr*) αλλά και σε μοριακές συνοδούς αναδίπλωσης πρωτεϊνών (π.χ. οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *skp*, *osmY*, *secA*, *infB*, *dsbG*, *surA*, *degP*, *dsbC*, *iny*). Ταυτόχρονα μειωμένη εμφανίζεται η παραγωγή παραγόντων που σχετίζεται με καταβολικές διαδικασίες (π.χ. καταβολισμός γλυκίνης, γλυκόζης, ξυλόζης ή λυσίνης). Επιπλέον, κατά τη σύγκριση των δειγμάτων *E. coli* SuptoxR κυττάρων που παράγουν μια από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες BR2-GFP ή YidC-GFP, παρατηρούνται επίσης διαφορές, όπως αύξηση σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συγκρότηση της μεγάλης υπομονάδας των ριβοσωμάτων ή στην επεξεργασία του rRNA. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα θα μπορούσε να εξαχθεί η υπόθεση ότι η διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανοπρωτεϊνών στο SuptoxR είναι ένα δυναμικό φαινόμενο, όπου από το σύνολο των πρωτεϊνών του κυττάρου που επηρεάζονται από την υπερέκφραση του αναστολέα της RNάσης E, της RraA, εντοπίζεται ένα τμήμα αυτών σύμφωνα και με τα χαρακτηριστικά της μεμβρανοπρωτεΐνης που υπερεκφράζεται.



**Εικόνα 40:** Χρωματικός χάρτης συσχέτισης των γονιδίων που εκφράζονται στα διαφορετικά δείγματα σύμφωνα με την ανάλυση του συνόλου των παραγόμενων πρωτεϊνών. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει αυξημένη παραγωγικότητα σε σχέση με το μέσο όρο των δειγμάτων, το πράσινο χρώμα υποδηλώνει μειωμένη παραγωγικότητα ενώ με γκρι σημειώνονται τα γονίδια στα οποία δε παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή.



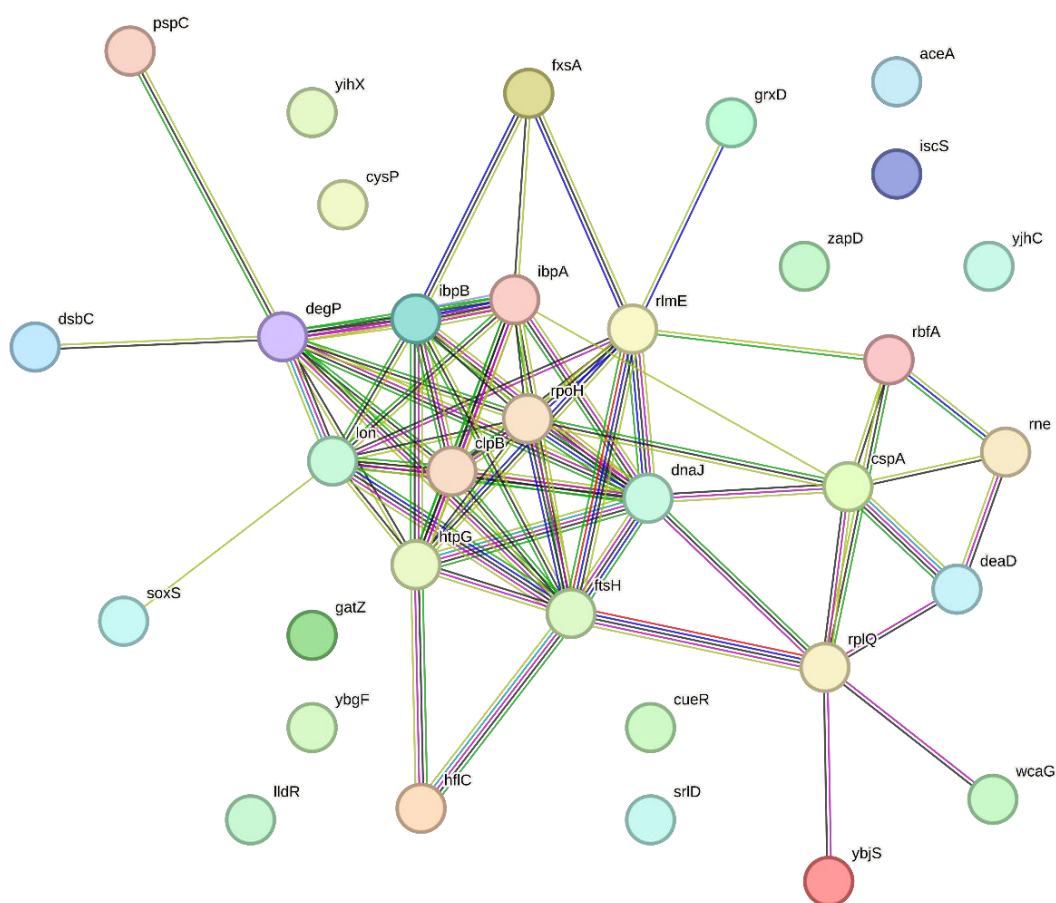
**Εικόνα 41:** Διάγραμμα διαφορών του πρωτεϊνικού προφίλ *E. coli* κυττάρων MC1061 που εκφράζουν τη μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση του γονιδίου *rraA*.

**Πίνακας 4:** Γονίδια και πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση άνω-ρυθμίζεται σημαντικά κατά την συνέκφραση του γονιδίου *rraA* με την μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP.

| Γονίδιο     | Πρωτεΐνη   | Πρώτη περιγραφή της πρωτεΐνης                   |
|-------------|------------|-------------------------------------------------|
| <i>ndh</i>  | DHNA_ECOLI | NADH dehydrogenase                              |
| <i>srlD</i> | SRLD_ECOLI | Sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase            |
| <i>rsmA</i> | RSMA_ECOLI | Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A |
| <i>dnaJ</i> | DNAJ_ECOLI | Chaperone protein DnaJ                          |
| <i>ompT</i> | OMPT_ECOLI | Protease 7                                      |
| <i>iscS</i> | ISCS_ECOLI | Cysteine desulfurase IscS                       |
| <i>htpG</i> | HTPG_ECOLI | Chaperone protein HtpG                          |

| Γονίδιο          | Πρωτεΐνη              | Πρώτη περιγραφή της πρωτεΐνης                                 |
|------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>rbfA</i>      | RBFA_ECOLI            | 30S ribosome-binding factor                                   |
| <i>yihX</i>      | YIHX_ECOLI            | Alpha-D-glucose 1-phosphate phosphatase<br>YihX               |
| <i>cspA;cspG</i> | CSPA_ECOLI;CSPG_ECOLI | Cold shock-like protein CspG                                  |
| <i>soxS</i>      | SOXS_ECOLI            | Regulatory protein SoxS                                       |
| <i>dnaK</i>      | DNAK_ECOLI            | Chaperone protein DnaK                                        |
| <i>pheA</i>      | CMPDT_ECOLI           | Bifunctional chorismate mutase/prephenate<br>dehydratase      |
| <i>lon</i>       | LON_ECOLI             | Lon protease                                                  |
| <i>cspA</i>      | CSPA_ECOLI            | Cold shock protein CspA                                       |
| <i>ftsH</i>      | FTSH_ECOLI            | ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH                       |
| <i>atpA</i>      | ATPA_ECOLI            | ATP synthase subunit alpha                                    |
| <i>hflC</i>      | HFLC_ECOLI            | Modulator of FtsH protease HflC                               |
| <i>lldR</i>      | LLDR_ECOLI            | Putative L-lactate dehydrogenase operon<br>regulatory protein |
| <i>dsbC</i>      | DSBC_ECOLI            | Thiol:disulfide interchange protein DsbC                      |
| <i>pspC</i>      | PSPC_ECOLI            | Phage shock protein C                                         |
| <i>yciO</i>      | YCIO_ECOLI            | Uncharacterized protein YciO                                  |
| <i>rpoH</i>      | RPOH_ECOLI            | RNA polymerase sigma factor RpoH                              |
| <i>ibpA</i>      | IBPA_ECOLI            | Small heat shock protein IbpA                                 |
| <i>ibpB</i>      | IBPB_ECOLI            | Small heat shock protein IbpB                                 |
| <i>rlmE</i>      | RLME_ECOLI            | Ribosomal RNA large subunit<br>methyltransferase E            |
| <i>cueR</i>      | CUER_ECOLI            | HTH-type transcriptional regulator CueR                       |
| <i>degP</i>      | DEGP_ECOLI            | Periplasmic serine endoprotease DegP                          |
| <i>gatZ</i>      | GATZ_ECOLI            | D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit<br>GatZ          |
| <i>cysP</i>      | CYSP_ECOLI            | Thiosulfate-binding protein                                   |
| <i>rne</i>       | RNE_ECOLI             | Ribonuclease E                                                |
| <i>fcl</i>       | FCL_ECOLI             | GDP-L-fucose synthase                                         |
| <i>zapD</i>      | ZAPD_ECOLI            | Cell division protein ZapD                                    |

| Γονίδιο     | Πρωτεΐνη   | Πρώτη περιγραφή της πρωτεΐνης       |
|-------------|------------|-------------------------------------|
| <i>fxsA</i> | FXSA_ECOLI | UPF0716 protein FxsA                |
| <i>yjhC</i> | YJHC_ECOLI | Uncharacterized oxidoreductase YjhC |
| <i>clpB</i> | CLPB_ECOLI | Chaperone protein ClpB              |
| <i>ybjS</i> | YBJS_ECOLI | Uncharacterized protein YbjS        |



**Εικόνα 42: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών.** Οι κόμβοι αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες και οι ακμές τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Η εικόνα έχει εξαχθεί από την βάση δεδομένων STRING.

**Πίνακας 5: Γονίδια και πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση κάτω-ρυθμίζεται σημαντικά κατά την συνέκφραση του γονιδίου *rra4* με την μεμβρανοπρωτεΐνη BR2-GFP.**

| Γονίδιο     | Πρωτεΐνη    | Πρώτη περιγραφή της πρωτεΐνης                              |
|-------------|-------------|------------------------------------------------------------|
| <i>ansB</i> | ASPG2_ECOLI | L-asparaginase 2                                           |
| <i>aroF</i> | AROF_ECOLI  | Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Tyr-sensitive |
| <i>tyrB</i> | TYRB_ECOLI  | Aromatic-amino-acid aminotransferase                       |
| <i>tar</i>  | MCP2_ECOLI  | Methyl-accepting chemotaxis protein II                     |
| <i>nirB</i> | NIRB_ECOLI  | Nitrite reductase (NADH) large subunit                     |
| <i>pyrF</i> | PYRF_ECOLI  | Orotidine 5'-phosphate decarboxylase                       |
| <i>ptsI</i> | PT1_ECOLI   | Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase             |
| <i>aroA</i> | AROA_ECOLI  | 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase               |
| <i>dapF</i> | DAPF_ECOLI  | Diaminopimelate epimerase                                  |
| <i>dapA</i> | DAPA_ECOLI  | 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase                  |
| <i>greA</i> | GREA_ECOLI  | Transcription elongation factor GreA                       |
| <i>pfkA</i> | PFKA_ECOLI  | ATP-dependent 6-phosphofructokinase isozyme 1              |
| <i>pyrE</i> | PYRE_ECOLI  | Orotate phosphoribosyltransferase                          |
| <i>selA</i> | SELA_ECOLI  | L-seryl-tRNA(Sec) selenium transferase                     |
| <i>nanR</i> | NANR_ECOLI  | HTH-type transcriptional repressor NanR                    |
| <i>yidA</i> | YIDA_ECOLI  | Sugar phosphatase YidA                                     |
| <i>mntR</i> | MNTR_ECOLI  | Transcriptional regulator MntR                             |
| <i>rbsK</i> | RBSK_ECOLI  | Ribokinase                                                 |
| <i>phoH</i> | PHOH_ECOLI  | Protein PhoH                                               |
| <i>proC</i> | P5CR_ECOLI  | Pyrroline-5-carboxylate reductase                          |
| <i>asd</i>  | DHAS_ECOLI  | Aspartate-semialdehyde dehydrogenase                       |
| <i>uspE</i> | USPE_ECOLI  | Universal stress protein E                                 |
| <i>ybhL</i> | YBHL_ECOLI  | Inner membrane protein YbhL                                |
| <i>atpB</i> | ATP6_ECOLI  | ATP synthase subunit a                                     |
| <i>bolA</i> | BOLA_ECOLI  | DNA-binding transcriptional regulator BolA                 |
| <i>cdd</i>  | CDD_ECOLI   | Cytidine deaminase                                         |
| <i>clpA</i> | CLPA_ECOLI  | ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA        |
| <i>gloA</i> | LGUL_ECOLI  | Lactoylglutathione lyase                                   |
| <i>yibF</i> | YIBF_ECOLI  | Uncharacterized GST-like protein YibF                      |
| <i>uspA</i> | USPA_ECOLI  | Universal stress protein A                                 |
| <i>fre</i>  | FRE_ECOLI   | NAD(P)H-flavin reductase                                   |
| <i>moaB</i> | MOAB_ECOLI  | Molybdenum cofactor biosynthesis protein B                 |
| <i>narL</i> | NARL_ECOLI  | Nitrate/nitrite response regulator protein NarL            |
| <i>rmf</i>  | RMF_ECOLI   | Ribosome modulation factor                                 |
| <i>trmL</i> | TRML_ECOLI  | tRNA (cytidine(34)-2'-O)-methyltransferase                 |
| <i>ppnP</i> | PPNP_ECOLI  | Pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase                 |

| Γονίδιο          | Πρωτεΐνη              | Πρώτη περιγραφή της πρωτεΐνης                                                       |
|------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>pepP</i>      | AMPP_ECOLI            | Xaa-Pro aminopeptidase                                                              |
| <i>dmsA;ynfE</i> | DMSA_ECOLI;YNFE_ECOLI | Dimethyl sulfoxide reductase DmsA                                                   |
| <i>cysQ</i>      | CYSQ_ECOLI            | 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase CysQ                                            |
| <i>serC</i>      | SERC_ECOLI            | Phosphoserine aminotransferase                                                      |
| <i>preA</i>      | PREA_ECOLI            | NAD-dependent dihydropyrimidine dehydrogenase subunit PreA                          |
| <i>acul</i>      | ACUI_ECOLI            | Probable acrylyl-CoA reductase AcuI                                                 |
| <i>tktA;tktB</i> | TKT1_ECOLI;TKT2_ECOLI | Transketolase 1                                                                     |
| <i>wecC</i>      | WECC_ECOLI            | UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase                                            |
| <i>pepT</i>      | PEPT_ECOLI            | Peptidase T                                                                         |
| <i>nadC</i>      | NADC_ECOLI            | Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]                             |
| <i>modF</i>      | MODF_ECOLI            | ABC transporter ATP-binding protein ModF                                            |
| <i>yiiQ</i>      | YIIQ_ECOLI            | Uncharacterized protein YiiQ                                                        |
| <i>yejK</i>      | NDPA_ECOLI            | Nucleoid-associated protein YejK                                                    |
| <i>nudK</i>      | NUDK_ECOLI            | GDP-mannose pyrophosphatase NudK                                                    |
| <i>yjiI</i>      | YJII_ECOLI            | Uncharacterized protein YjiI                                                        |
| <i>ghrB</i>      | GHRB_ECOLI            | Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B                                              |
| <i>gpmI</i>      | GPMI_ECOLI            | 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase                         |
| <i>mpl</i>       | MPL_ECOLI             | UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase |
| <i>prmB</i>      | PRMB_ECOLI            | 50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase                                |
| <i>ygfF</i>      | YGFF_ECOLI            | Uncharacterized oxidoreductase YgfF                                                 |
| <i>pgl</i>       | 6PGL_ECOLI            | 6-phosphogluconolactonase                                                           |
| <i>guaC</i>      | GUAC_ECOLI            | GMP reductase                                                                       |
| <i>ispF</i>      | ISPF_ECOLI            | 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase                               |
| <i>yqeG</i>      | YQEG_ECOLI            | Inner membrane transport protein YqeG                                               |
| <i>yfgG</i>      | YFGG_ECOLI            | Protein YfgG                                                                        |
| <i>ubiT</i>      | UBIT_ECOLI            | Ubiquinone biosynthesis accessory factor UbiT                                       |
| <i>ygeY</i>      | YGEY_ECOLI            | Uncharacterized protein YgeY                                                        |
| <i>hldD</i>      | HLDD_ECOLI            | ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase                                           |
| <i>allE</i>      | ALLE_ECOLI            | (S)-ureidoglycine aminohydrolase                                                    |
| <i>ubiF</i>      | UBIF_ECOLI            | 3-demethoxyubiquinol 3-hydroxylase                                                  |
| <i>gsiB</i>      | GSIB_ECOLI            | Glutathione-binding protein GsiB                                                    |
| <i>ybjI</i>      | YBJI_ECOLI            | 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase YbjI                         |
| <i>dhaK</i>      | DHAK_ECOLI            | PEP-dependent dihydroxyacetone kinase, dihydroxyacetone-binding subunit DhaK        |
| <i>ynfF</i>      | YNFF_ECOLI            | Probable dimethyl sulfoxide reductase chain YnfF                                    |

Η ίδια διαδικασία της ανάλυσης του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγονται κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών θα πραγματοποιηθεί επίσης σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxRNE22, ούτως ώστε να εντοπιστούν παρόμοιες και διαφορετικές τροποποιήσεις του πρωτεϊνικού προφίλ, και τελικά να διερευνηθεί το κατά πόσο εμφανίζονται ομοιότητες μεταξύ των μοριακών μηχανισμών δράσης των *E. coli* στελεχών SuptoxR και SuptoxRNE22 που κατασκευάστηκαν. Επιπλέον, για την απόκτηση μιας πιο πλήρους εικόνας των επιπτώσεων που έχει η μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση στο βακτήριο, καθώς και των τροποποιήσεων που πραγματοποιούνται στο επίπεδο των mRNA κατά τη συνέκφραση της RraA πρωτεΐνης ή κατά την έκφραση παραλλαγών της RNάσης E που φέρουν γενετικές απαλοιφές, θα πραγματοποιηθεί αλληλούχηση RNA (RNA sequencing) παρουσία και απουσία της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών σε κάθε στέλεχος. Έτσι θα είναι εφικτή η απόκτηση μιας πιο πλήρους εικόνας για το πως επηρεάζονται διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια τόσο στο στάδιο της μεταγραφής (αλληλούχηση RNA) όσο και στο στάδιο της μετάφρασης (πρωτεομική ανάλυση). Ο συνδυασμός της γνώσης που θα αποκτηθεί από τις δύο συστηματικές αναλύσεις που θα πραγματοποιηθούν σε όλα τα στελέχη που έχουν κατασκευαστεί μέχρι στιγμής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την περαιτέρω βελτιστοποίησή τους.

## **5.2. Εφαρμογή μεθόδων κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών για την κατασκευή βελτιωμένων βακτηριακών στελεχών SuptoxR τρίτης γενιάς.**

Στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας, κατασκευάστηκαν τα βακτηριακά στελέχη δεύτερης γενιάς, SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, που έφεραν τις βελτιωμένες φυσικές παραλλαγές *PmrraA* και *PsrraA*, του αρχικού *EcrraA* γονιδίου που εκφράζεται στο αρχικό SuptoxR στέλεχος. Οι παραλλαγές αυτές αναζητήθηκαν στα γονιδιώματα πρωτεοβακτηρίων και φυτικών χλωροπλαστών, όπου κωδικοποιούνται ομόλογες RraAπρωτεΐνες. Σύμφωνα με αυτά τα

δεδομένα, φαίνεται ότι δυνητικά μπορούν να υπάρχουν περισσότερες βελτιωμένες παραλλαγές της φυσικής RraA του *E. coli* που θα επιφέρουν βελτιωμένα αποτελέσματα, ενισχύοντας την διαδικασία της υπερέκφρασης μεμβρανοπρωτεϊνών στο βακτήριο. Μια δεύτερη προσέγγιση για τον εντοπισμό τέτοιων βελτιωμένων παραλλαγών της RraA, είναι η αναζήτησή τους μέσω εφαρμογής μεθόδων πρωτεϊνικής μηχανικής και κατευθυνόμενης εξέλιξης πρωτεϊνών. Η εξελικτική πίεση που ασκείται σε όλα τα χρόνια της εξέλιξης, δεν ωθεί την φυσική βελτιστοποίηση της RraA στην κατεύθυνση της ενίσχυσης της παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο, αλλά στη βελτίωση της φυσιολογικής της λειτουργίας, δηλαδή της αναστολής της δραστηριότητας της RNάσης E με τέτοιο τρόπο ώστε να διασφαλίζεται, σε συνεργασία με τη δράση των υπόλοιπων ρυθμιστικών παραγόντων, η βέλτιστη ισορροπία των μηχανισμών πρωτεϊνοσύνθεσης και αποδόμησης μορίων mRNA που δεν είναι χρήσιμα από το κύτταρο σε κάθε χρονική περίοδο.

Έτσι, προτείνεται η κατασκευή συνδυαστικών βιβλιοθηκών εκατομμυρίων τυχαίων παραλλαγών του *E. coli rraA* γονιδίου, καθώς και των ομόλογων γονιδίων *P. mirabilis rraA* και *P. stuartii rraA*, που βρέθηκαν να κωδικοποιούν ομόλογες RraA πρωτεΐνες που είναι πιο αποτελεσματικές σε σύγκριση με την αρχική στην ενίσχυση της παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Η κατασκευή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί υποβάλλοντας τα γονίδια σε τυχαία μεταλλαξιγένεση μέσω επιρρεπούς σε σφάλμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (error-prone PCR) (Fromant et al., 1995; Skretas and Wood, 2005). Στη συνέχεια, η βιβλιοθήκη των μεταλλαγμένων ακολουθιών του γονιδίου *rraA* θα κλωνοποιηθεί στο πλασμίδιο pBAD33, και θα επιλεγθούν οι παραλλαγές της RraA που επιδεικνύουν αυξημένη ικανότητα να προάγουν τη μεμβρανοπρωτεϊνική υπερέκφραση, με εφαρμογή ενός γενετικού συστήματος σάρωσης υψηλής ρυθμαπόδοσης. Στο σύστημα αυτό, θα διερευνηθεί ο φθορισμός των *E. coli* κυττάρων που παράγουν τη χίμαιρα BR2-GFP, όπως περιεγράφηκε στην παρούσα έρευνα, με ταυτόχρονη συν-έκφραση της συνδυαστικής βιβλιοθήκης των παραλλαγών της RraA, και θα απομονωθούν τα

βακτηριακά στελέχη που επιδεικνύουν αυξημένα επίπεδα φθορισμού της BR2-GFP χρησιμοποιώντας φθορισμο-ενεργοποιούμενο κυτταροδιαχωρισμό (fluorescence-activated cell sorting, FACS), καθώς η τεχνική αυτή επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση του φθορισμού μεγάλου αριθμού κυττάρων, με μεγάλη ταχύτητα και διαχωρίζει τον πληθυσμό που αναλύθηκε σύμφωνα με αυτό τον φθορισμό. Οι παραλλαγές που προκαλούν τον φαινότυπο του αυξημένου φθορισμού θα απομονωθούν και θα ταυτοποιηθούν οι μεταλλαγές που κωδικοποιούνται στο *rraA* γονίδιο μέσω αλληλούχησης του πλασμιδιακού DNA. Τέλος, οι τεχνητές παραλλαγές που θα απομονωθούν με αυτό τον τρόπο, θα αξιολογηθούν ως προς την ικανότητά τους να αυξάνουν την παραγωγικότητα και άλλων προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μεμβρανοπρωτεϊνών και θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή βελτιστοποιημένων βακτηριακών στελεχών τρίτης γενιάς SuptoxR3.X.

### **5.3. Κατασκευή ενός πιο απλού και σταθερού βακτηριακού συστήματος υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών**

Το βακτηριακό στέλεχος SuptoxR, όπως αναφέρθηκε, στηρίζει τις ευεργετικές του ιδιότητες στην υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pBAD33, όπου η έκφρασή του έχει τεθεί υπό τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή και του μορίου-επαγωγέα, την L(+)-αραβινόζη. Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών στο SuptoxR, χρησιμοποιείται ένα δεύτερο πλασμίδιο, το οποίο έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά (αντίσταση σε αντιβιοτικό, σημείο έναρξης αντιγραφής) και στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την εκάστοτε μεμβρανική πρωτεΐνη-στόχο, υπό τον έλεγχο συνήθως του υποκινητή *tet* και του μορίου επαγωγέα, την ανυδροτετρακυκλίνη (aTc). Το σύστημα αυτό των δύο πλασμιδίων αν και έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικό, είναι αρκετά σύνθετο και ταυτόχρονα διαθέτει μερικά μειονεκτήματα όπως η χρήση δύο αντιβιοτικών ή το γεγονός ότι

ενδέχεται να υπάρχουν διαφοροποιήσεις στον αριθμό των πλασμιδιακών αντίγραφων που βρίσκονται κάθε φορά στα διαφορετικά βακτήρια. Επιπλέον, είναι πιθανό σε κάποιες περιπτώσεις τα βακτήρια να αποβάλλουν τα πιο ασταθή γενετικά μόρια, τα πλασμίδια, και έτσι τα κύτταρα που θα προκύψουν να μην είναι αποτελεσματικά στην υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι ευεργετικές λειτουργίες τους στηρίζονται στην ύπαρξη και διατήρηση πλασμιδίων στο βακτήριο. Όσο πιο σύνθετο είναι ένα σύστημα, δηλαδή όσο περισσότερα πλασμίδια έχει, τόσο πιο πιθανό είναι κάποιο από αυτά να αποβληθεί στη διαδικασία της κυτταρικής καλλιέργειας.

Προκειμένου να κατασκευαστεί ένα πιο απλό και πιο σταθερό σύστημα έκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών, επιχειρείται η ένθεση του γονιδίου *rraA* στο χρωμόσωμα του *E. coli*, υπό τον έλεγχο και πάλι του *araBAD* υποκινητή του οποίου η έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί από τον επαγωγέα του. Έτσι, στο σύστημα αυτό θα χρησιμοποιείται μόνο ένα πλασμίδιο το οποίο θα κωδικοποιεί την μεμβρανοπρωτεΐνη-στόχο που πρόκειται να παραχθεί. Η διαδικασία αυτή θα πραγματοποιηθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό σε προσχεδιασμένη θέση του βακτηριακού χρωμοσώματος, με χρήση της ρεκομπινάσης του λ-βακτηριοφάγου (Lambda Red Recombinase system), από το pKD-46 πλασμίδιο (Murphy, 1998; Datsenko and Wanner, 2000). Για το σκοπό αυτό το γονίδιο που κωδικοποιεί την RraA του *E. coli*, έχει κλωνοποιηθεί αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pBAD18-KanR. Στη συνέχεια, θα επιλεγθεί μια συγκεκριμένη περιοχή για την ένθεση του γονιδίου, θα σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές που θα έχουν ομολογία με αυτή την περιοχή του χρωμοσώματος και με την ανάλογη περιοχή του πλασμιδίου pBAD18-RraA. Με τη χρήση των εκκινητών αυτών θα ενισχυθεί το γραμμικό τμήμα του πλασμιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο *rraA*, τον υποκινητή *araBAD* και το γονίδιο που προσδίδει την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη ενώ ταυτόχρονα θα φέρει άκρα συμπληρωματικά με την επιλεγμένη περιοχή του χρωμοσώματος. Το τμήμα αυτό στη συνέχεια

θα εισαχθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό στο χρωμόσωμα με τη χρήση της ρεκομπινάσης του λ-φάγου.

Το νέο στέλεχος που θα προκύψει, θα πρέπει εκ νέου να μελετηθεί ως προς την ικανότητά του να καταστέλλει την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και την ικανότητά του να προάγει την παραγωγή τους. Επιπλέον θα πρέπει να ελεγχθούν και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες καλλιέργειας καθώς επίσης και τα επίπεδα έκφρασης κάθε πρωτεΐνης. Τελικός στόχος είναι η δημιουργία ενός σταθερού, ομοιογενούς και πλήρως ελεγχόμενου συστήματος, το οποίο θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, σε ίδια ή και καλύτερα επίπεδα σε σχέση με το αρχικό SuptoxR στέλεχος. Η διαδικασία θα επαναληφθεί και για τα *rraA* γονίδια από τους οργανισμούς *P. mirabilis* και *P. stuartii*, των οποίων η δράση έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματική σε σχέση με την RraA του *E. coli*, και έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή των βακτηριακών στελεχών δεύτερης γενιάς SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, τα οποία και πάλι χρησιμοποιούν ένα παρόμοιο σύστημα δύο πλασμιδίων, όπως το SuptoxR.



## **Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>**

### **Υλικά και μέθοδοι**

## 6. Υλικά και μέθοδοι

### 6.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Το σύνολο των ενζύμων περιορισμού, οι πολυμεράσες Taq και Phusion, η T4 λιγάση, και ο δείκτης μοριακών μαζών (1 kb ladder) που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων αγοράστηκαν από την εταιρία New England Biolabs. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το τυποποιημένο εμπορικό πακέτο NucleoSpin Plasmid της εταιρίας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθαρισμός προϊόντων που προέρχονται από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) καθώς και η εξαγωγή καθαρού DNA από πηκτή αγαρόζης μετά από ανάλυση με ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιήθηκε με το τυποποιημένο εμπορικό πακέτο Nucleospin Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey-Nagel.

Οι βακτηριακές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB) αποτελούμενο από 1% χλωριούχο νάτριο (NaCl), 1% τρυπτόνη (tryptone) και 0.5% εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) ή στερεό θρεπτικό μέσο LB με επιπλέον προσθήκη 1.5% άγαρ (PanReac AppliChem). Για την επιλογή των βακτηριακών αποικιών ή καλλιιεργειών που έφεραν τα πλασμίδια ενδιαφέροντος προστέθηκε σε κάθε περίπτωση ο κατάλληλος συνδυασμός αντιβιοτικών (100μg/mL αμπικιλίνη, 40μg/mL χλωραμφαινικόλη, 50 μg/mL καναμυκίνη).

Τα μόρια-επαγωγείς της πρωτεϊνικής έκφρασης ανυδροτετρακυκλίνη (anhydrotetracycline, aTc) και L(+)-αραβινόζη (L(+)-arabinose) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma, το αντιδραστήριο της ρετινάλης (all-*trans*-retinal) από την εταιρία Cayman Chemical και η επιφανειοενεργή ουσία n-dodecyl-D-maltoside (DDM) από την εταιρία Glycon Biochemicals. Τα αντιδραστήρια NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tris-Base, imidazole, HEPES, γλυκίνη και phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) αγοράστηκαν από την εταιρία PanReac AppliChem ενώ

τα αντιδραστήρια Tween-20, μεθανόλη, γλυκερόλη, sodium dodecyl sulfate (SDS) και dithiothreitol (DTT) από την εταιρία Thermo Fisher Scientific.

## 6.2. Βακτηριακά στελέχη

Το σύνολο των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στη διδακτορική εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 6**. Για την κατασκευή των βακτηριακών στελεχών δεύτερης γενιάς SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, χρησιμοποιήθηκαν *E. coli* κύτταρα MC1061, όμοια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του αρχικού στελέχους SuptoxR (Gialama et al., 2017b). Τα βακτηριακά στελέχη ENS134, ENS134-2, ENS134-10, ENS134-14, ENS134-17, ENS134-18, ENS134-21, ENS134-22, ENS134-23 και ENS134-24 ήταν ευγενική παραχώρηση από τον Dr. Agamemnon Carpousis (Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse). Τα στελέχη C41(DE3) και C43 (DE3) είχαν αγοραστεί από την εταιρία Lucigen ενώ το στέλεχος Lemo21 (DE3) από την εταιρία New England Biolabs.

**Πίνακας 6: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν**

| Βακτηριακό<br>στέλεχος | Γονότυπος                                                                                                                                                | Αναφορά                     |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| MC1061                 | $F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139]B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+)$             | (Casadaban and Cohen, 1980) |
| SuptoxR                | $F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139]B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+) pSuptoxR$    | (Gialama et al., 2017b)     |
| SuptoxR2.1             | $F^- \lambda^- \Delta(ara-leu)7697 [araD139]B/r \Delta(codB-lacI)3 galK16 galE15 e14^- mcrA0 relA1 rpsL150(Str^R) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^-m^+) pSuptoxR2.1$ | Παρούσα εργασία             |

| Βακτηριακό<br>στέλεχος | Γονότυπος                                                                                                                                                                                                                                                           | Αναφορά                |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| SuptoxR2.2             | F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 [ <i>araD139</i> ]B/r Δ( <i>codB-lacI</i> )3<br><i>galK16 galE15</i> e14 <sup>-</sup> <i>mcrA0 relA1 rpsL150</i> (Str <sup>R</sup> )<br><i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r <sup>-</sup> m <sup>+</sup> ) pSuptoxR2.2 | Παρούσα εργασία        |
| ENS134                 | BL21(DE3), <i>lacZ</i> ::Tn10,<br><i>malPpA534::PT7lacZ</i> ::RBSIamB-Arg5                                                                                                                                                                                          | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-2               | ENS134 <i>rne131</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-10              | ENS134 <i>rneΔ10</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-14              | ENS134 <i>rneΔ14</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-17              | ENS134 <i>rneΔ17</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-18              | ENS134 <i>rneΔ18</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-21              | ENS134 <i>rneΔ21</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-22              | ENS134 <i>rneΔ22</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-23              | ENS134 <i>rneΔ23</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| ENS134-24              | ENS134 <i>rneΔ24</i>                                                                                                                                                                                                                                                | (Leroy et al., 2002)   |
| C41(DE3)               | F – <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)                                                                                                                                                                                                                | Lucigen                |
| C43(DE3)               | F – <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)                                                                                                                                                                                                                | Lucigen                |
| Lemo21(DE3)            | <i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3)<br>[ <i>dcm</i> ] Δ <i>hsdS</i> / pLemo(Cam <sup>R</sup> ) λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> o<br>Δ <i>EcoRI-B int::</i> ( <i>lacI::PlacUV5::T7 gene1</i> ) <i>i21</i><br>Δ <i>nin5</i> pLemo = pACYC184- <i>PrhaBAD-lysY</i>             | New England<br>Biolabs |

### 6.3. Εύρεση και επιλογή φυσικών παραλλαγών της RraA

Η αναζήτηση RraA πρωτεϊνών σε πρωτεοβακτήρια και φυτά πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLASTp (Altschul et al., 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information), μέσω του οποίου αναζητήθηκαν σε πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων αμινοξικές ακολουθίες που να μοιάζουν με την RraA του οργανισμού *E. coli*. Η επιλογή των οργανισμών από τους οποίους προέρχονται οι επιπλέον RraA πρωτεΐνες που εξετάστηκαν, πραγματοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα ομοιότητας/ταύτισης της εκάστοτε ακολουθίας με την αρχική αμινοξική ακολουθία της *E. coli* RraA.

### 6.4. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων έκφρασης

Όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση ανασυνδυασμένου DNA αγοράστηκαν από την εταιρία New England Biolabs. Η κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων pASKBR2-EGFP, pET-28a(+)-BR2-GFP, pASKMdfA-EGFP και pSuptoxR (pBAD33RraA) περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενη δημοσίευση (Gialama et al., 2017b). Το πλασμίδιο pASKCLRN1-EGFP, που εκφράζει την μεμβρανική πρωτεΐνη Clarin-1, κατασκευάστηκε με αντικατάσταση του γονιδίου *BDKRB2* (που εκφράζει την πρωτεΐνη BR2) στο πλασμίδιο pASKBR2-EGFP, με το γονίδιο *CLRN1* (Addgene NM\_174878.2) χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *XbaI* και *BamHI*. Η κατασκευή των πλασμιδίων pASKCB1-GFP και pASKCB2-GFP περιγράφεται από τους Link et al (Link et al., 2008), του πλασμιδίου pBADBR2-GFP από τους Skretas και Georgiou (Skretas and Georgiou, 2010) ενώ των πλασμιδίων pASKMscL-EGFP και pASKHtdR από τους Michou et al. (Michou et al., 2019). Για την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων pBAD33RraA<sub>P. mirabilis</sub> (pSuptoxR2.1), pBAD33RraA<sub>P. stuartii</sub> (pSuptoxR2.2), pBAD33RraA<sub>K.pneumoniae</sub>, pBAD33RraA<sub>E. gergoviae</sub>, pBAD33RraA<sub>E. cloacae</sub>, pBAD33RraA<sub>S. marcescens</sub>, pBAD33RraA<sub>A. baumannii</sub>, pBAD33RraA<sub>S. enterica</sub> και pBAD33RraA<sub>M. domestica</sub>, τα αντίστοιχα *rraA* γονίδια ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (**Πίνακας 7**) που υβριδίζουν πάνω στο γενωμικό DNA κάθε οργανισμού, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τη διαδικασία της κλωνοποίησης. Το πλασμίδιο pBAD33RraA<sub>A. thaliana</sub> δημιουργήθηκε κλωνοποιώντας μεταξύ των θέσεων περιορισμού *Xba*I και *Hind*III ένα συνθετικό γονίδιο από την εταιρία Genscript Corp, το οποίο κωδικοποιούσε την RraA του οργανισμού *Arabidopsis thaliana* από νουκλεοτιδική ακολουθία που περιείχε βελτιστοποιημένα, ως προς την παραγωγή στο *E. coli*, κωδικόνια. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πλασμιδίων που κωδικοποιούν *rraA* γονίδια και υβριδίζουν στο εμπρόσθιο τμήμα του γονιδίου (forward primer), περιείχαν επιπλέον μια θέση περιορισμού για το ένζυμο *Xba*I, μια βελτιστοποιημένη ακολουθία Shine-Dalgarno (AGGAGGAAACG) και ένα κωδικόνιο έναρξης μεταγραφής (ATG), ενώ αυτοί που υβριδίζουν στο τελικό τμήμα του γονιδίου (reverse primer) κωδικοποιούσαν επίσης για ένα επίτοπο 6 ιστιδινών (6xHis tag, CATCACCATCACCATCAC), ένα από τα κωδικόνια τερματισμού μεταγραφής (stop codon) και μια θέση περιορισμού του ενζύμου *Hind*III. Τα πλασμίδια pSuptoxR2.1 [untagged] (pBAD33RraA<sub>P.mirabilis</sub>) και pSuptoxR2.2 [untagged] (pBAD33RraA<sub>P.stuartii</sub>) κατασκευάστηκαν όμοια με τους πλασμιδιακούς φορείς pSuptoxR2.1(pBAD33RraA<sub>P.mirabilis</sub>) και pSuptoxR2.2 (pBAD33RraA<sub>P.stuartii</sub>) με τη διαφορά ότι ο εκκινητής που υβριδίζει στο τελικό τμήμα του γονιδίου δεν κωδικοποιούσε για το επίτοπο των έξι ιστιδινών. Η επιβεβαίωση της ορθής κατασκευής όλων των πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση DNA.

**Πίνακας 7: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν**

| Όνομα εκκινητή | Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'                       |
|----------------|-------------------------------------------------|
| KpnRraA_For    | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATACGATACTTCCGAGCTT |

| Όνομα<br>εκκινητή     | Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'                                  |
|-----------------------|------------------------------------------------------------|
| KpnRraA_His_Rev       | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGTTCGATATCCAGCG<br>GGTCTTC  |
| EgerRraA_For          | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATACGATACATCCGAG<br>CTT        |
| EgerRraA_His_Rev      | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGTTCGATATCGAGCG<br>CGTCTTC  |
| PsRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATATGATACTTCCGAA<br>CTC        |
| PsRraA_His_Rev        | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGGAGGTCGTCGTCTA<br>GTA CTTC |
| PsRraA_non<br>His_Rev | TTTTTAAGCTTTTAGAGGTCGTCGTCTAGTACTTC                        |
| EcloRraA_For          | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATACGATACCTCCGAG<br>CTT        |
| EcloRraA_His_Rev      | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGCTCAATATCCAGCG<br>GATCTTC  |
| SmRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATACGATACTTCCGAA<br>CTT        |
| SmRraA_His_Rev        | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGCTCGATGTCTGAGCG<br>GGTCTTC |
| AbRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGGACGGTAAGTTCTTTAAA<br>AGT        |

| Όνομα<br>εκκινητή     | Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'                                  |
|-----------------------|------------------------------------------------------------|
| AbRraA_His_R<br>ev    | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGGACTAGTTTTCTT<br>TAGCAAT   |
| PmRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATATGATACTTCTGAA<br>CT         |
| PmRraA_His_R<br>ev    | TTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGTTCTTCTAATAAAT<br>CATCATC  |
| PmRraA_non<br>His_Rev | AAAAAAAGCTTTCATTATTCTTCTAATAAATCATCATCTA                   |
| AtRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGGCATTGTGTTACCACAGCC<br>GAA       |
| AtRraA_non<br>His_Rev | TTTTTTAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGGTGATGAAC                       |
| SeRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGAAATACGATACTTCCGAG<br>CTT        |
| SeRraA_His_Re<br>v    | TTTTTTAAGCTTTCAGTGGTGATGGTGGTGATGCTCGATATCAAGC<br>GGGTCTTC |
| MdRraA_For            | AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGGCCTTGGTTACAACCTGCT<br>GAA       |
| MdRraA_His_R<br>ev    | TTTTTTAAGCTTTCAGTGGTGATGGTGGTGATGGACAGATAACTC<br>GGTACGAGA |

**Πίνακας 8: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν**

| Πλασμίδιο             | Πρωτεΐνη                               | Ανθεκτικό-<br>τητα | Αρχή<br>αντιγραφής | Αναφορά                      |
|-----------------------|----------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| pASKBR2-EGFP          | FLAG-BR2-<br>TEV-EGFP-His <sup>6</sup> | Amp <sup>R</sup>   | ColE1              | (Gialama et al., 2017b)      |
| pBADBR2-GFP           | FLAG-BR2-<br>TEVGFP-His8               | Amp <sup>R</sup>   | ColE1              | (Skretas and Georgiou, 2010) |
| pET-28a(+)-BR2-GFP    | FLAG-BR2-<br>GFP-His8                  | Kan <sup>R</sup>   | ColE1              | (Gialama et al., 2017b)      |
| pASKCB1-GFP           | FLAG-CB1-<br>TEV-GFP-His <sup>8</sup>  | Amp <sup>R</sup>   | ColE2              | (Link et al., 2008)          |
| pASKCB2-GFP           | FLAG-CB2-<br>TEV-GFP-His <sup>8</sup>  | Amp <sup>R</sup>   | ColE3              | (Link et al., 2008)          |
| pASKMscL-EGFP         | MscL-His <sup>6</sup>                  | Amp <sup>R</sup>   | ColE3              | (Michou et al., 2019)        |
| pASKCLRN1-EGFP        | CLRN1-EGFP-<br>His <sup>6</sup>        | Amp <sup>R</sup>   | ColE3              | Παρούσα<br>εργασία           |
| pASKHtdR              | His <sup>8</sup> -HtdR-<br>FLAG        | Amp <sup>R</sup>   | ColE3              | (Michou et al., 2019)        |
| pASKMdfA-GFP          | FLAG-MdfA-<br>GFP-His <sup>8</sup>     | Amp <sup>R</sup>   | ColE3              | (Gialama et al., 2017b)      |
| pSuptoxR (pBAD33RraA) | RraA-His <sup>8</sup>                  | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | (Gialama et al., 2017b)      |

| Πλασμίδιο                                                             | Πρωτεΐνη                                                | Ανθεκτικό-<br>τητα | Αρχή<br>αντιγραφής | Αναφορά                   |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|
| pSuptoxR2.1<br>(pBAD33RraA <i>P.mirabilis</i> )                       | RraA <sub><i>P. mirabilis</i></sub> -His <sup>6</sup>   | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pSuptoxR2.2<br>(pBAD33RraA <i>P.stuartii</i> )                        | RraA <sub><i>P. stuartii</i></sub> -His <sup>6</sup>    | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pSuptoxR [untagged]<br>(pBAD33RraA)                                   | RraA                                                    | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | (Michou et al.,<br>2019). |
| pSuptoxR2.1 [untagged]<br>(pBAD33RraA <sub><i>P.mirabilis</i></sub> ) | RraA <sub><i>P. mirabilis</i></sub>                     | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pSuptoxR2.2 [untagged]<br>(pBAD33RraA <sub><i>P.stuartii</i></sub> )  | RraA <sub><i>P. stuartii</i></sub>                      | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pBAD33RraA <sub><i>S. enterica</i></sub>                              | RraA <sub><i>S. enterica</i></sub> -His <sup>6</sup>    | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pBAD33RraA <sub><i>E. cloacae</i></sub>                               | RraA <sub><i>E. cloacae</i></sub> -His <sup>6</sup>     | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pBAD33RraA <sub><i>K. pneumoniae</i></sub>                            | RraA <sub><i>K. pneumoniae</i></sub> - His <sup>6</sup> | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pBAD33RraA <sub><i>S. marcescens</i></sub>                            | RraA <sub><i>S. marcescens</i></sub> - His <sup>6</sup> | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pBAD33RraA <sub><i>A. baumannii</i></sub>                             | RraA <sub><i>A. baumannii</i></sub> - His <sup>6</sup>  | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |
| pBAD33RraA <sub><i>A. thaliana</i></sub>                              | RraA <sub><i>A. thaliana</i></sub> -His <sup>6</sup>    | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία        |

| Πλασμίδιο                          | Πρωτεΐνη                                           | Ανθεκτικό-<br>τητα | Αρχή<br>αντιγραφής | Αναφορά            |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| pBAD33RraA <sub>M. domestica</sub> | RraA <sub>M. domestica</sub> -<br>His <sup>6</sup> | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία |
| pBAD33RraA <sub>E. gergoviae</sub> | RraA <sub>E. gergoviae</sub> -<br>His <sup>6</sup> | Cm <sup>R</sup>    | ACYC               | Παρούσα<br>εργασία |

## 6.5. Υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Σε όλα τα πειράματα υπερέκφρασης μεμβρανοπρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί με τους κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς και επωαστεί στους 37 °C για 16 ώρες, προκειμένου να σχηματιστούν βακτηριακές αποικίες σε τριβλία με στερεό θρεπτικό διάλυμα LB που εμπεριείχε τον αντίστοιχο συνδυασμό αντιβιοτικών (100 µg/mL αμπικιλίνη, 40 µg/mL χλωραμφαινικόλη, 50 µg/mL καναμυκίνη). Από τα τριβλία αυτά επιλέχθηκαν τυχαία μεμονωμένες αποικίες προκειμένου να εμβολιαστούν και να αναπτυχθούν για 16 ώρες στους 37 °C υγρές LB καλλιέργειες, οι οποίες επίσης περιείχαν τον κατάλληλο συνδυασμό αντιβιοτικών. Οι υγρές καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν με αραίωση 1:50 για τον εμβολιασμό νέων υγρών LB καλλιεργειών, οι οποίες επώαστηκαν στους 30 °C με ανάδευση στις 220 rpm μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD<sub>600</sub>) να είναι περίπου ίση με 0.4 - 0.5. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση τα βακτηριακά στελέχη MC1061, SuptoxR, SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2 στο στάδιο αυτό προστέθηκε επιπλέον 0.2 % L-(+) αραβινόζη. Στη συνέχεια η θερμοκρασία του επωαστικού θαλάμου μειώθηκε στους 25 °C και ύστερα από ένα μικρό χρονικό διάστημα 10 – 20 λεπτών, η θερμοκρασία εξισορροπήθηκε και πραγματοποιήθηκε επαγωγή της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης με την προσθήκη του κατάλληλου μορίου επαγωγέα (0.2 µg/mL ανυδροτετρακυκλίνη (aTc), 0.1 ή 0.4 mM IPTG) για

16 ώρες. Κατά την υπερέκφραση της μεμβρανοπρωτεΐνης HtdR ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι ταυτόχρονα με τον επαγωγέα, προστέθηκε επιπλέον ρετινάλη (10  $\mu$ M all-*trans* retinal) και η επώαση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες σκότους για 16 ώρες.

## **6.6. Απομόνωση μεμβρανών**

Προκειμένου να απομονωθεί το κλάσμα των βακτηριακών καλλιέργειών που περιέχει το σύνολο των μεμβρανών των κυττάρων, η υπερέκφραση των μεμβρανοπρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε 1 L θρεπτικού υλικού LB. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 λεπτά και επαναιωρήθηκαν σε 10 mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15% γλυκερόλη, 2 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), pH 7.5). Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε είτε με χρήση υπερήχων που εφαρμόστηκαν για μικρά διαδοχικά χρονικά διαστήματα (20 δευτερόλεπτα) καθώς το δείγμα ψυχόταν συνεχόμενα σε πάγο, είτε με χρήση μηχανήματος διάρρηξης κυττάρων υπό πίεση (30 kpsi) (Constant System). Από το μίγμα που προέκυψε απομακρύνθηκαν όλα τα αδιάλυτα στοιχεία και τα κυτταρικά θραύσματα με φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 λεπτά, και στη συνέχεια το υπερκείμενο το οποίο περιείχε και το μεμβρανικό κλάσμα, υποβλήθηκε σε υπερφυγοκέντρηση στις 42.000 rpm (130.000 g) για 1 ώρα στους 4 °C, χρησιμοποιώντας τον ρότορα Beckman 70Ti. Το τελικό μεμβρανικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5 mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και το μίγμα ομογενοποιήθηκε.

## **6.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE)**

Για την ανάλυση των παραγόμενων πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 12% παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS), υπό αποδιατακτικές συνθήκες (με θέρμανση των δειγμάτων στους 70-95 °C για 5-10 λεπτά πριν τη φόρτωσή τους

στην πηκτή) ή υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες (χωρίς προηγούμενη θέρμανση των δειγμάτων), σύμφωνα με τις απαιτήσεις της μεθόδου που επρόκειτο να ακολουθηθεί στη συνέχεια. Κάθε δείγμα πριν την φόρτωση στην πηκτή αναμίχθηκε με διάλυμα φόρτωσης (loading dye) που περιείχε DTT και αναλύθηκε σε χαμηλή τάση 80-120 V για 1,5 ώρες.

#### **6.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου απουσία αποδιατακτικών παραγόντων (native-PAGE)**

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με βάση το μοριακό τους βάρος σε εγγενείς συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% που δεν περιείχε SDS ή κάποιον άλλο αποδιατακτικό παράγοντα. Τα δείγματα αναμίχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης που επίσης δεν περιείχε SDS και δεν θερμάνθηκαν καθόλου πριν την ανάλυσή τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία ~ 4 °C, σε χαμηλή τάση 80-100 V για περίπου 2 ώρες.

#### **6.9. Ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού**

Η ανίχνευση του ενδοπηκτικού φθορισμού (in-gel fluorescence) πραγματοποιήθηκε ύστερα από ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων που δεν είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία, και είχαν αναλυθεί σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία ή απουσία SDS. Για την ανάλυση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το σύστημα UVP ChemiDoc-It<sup>2</sup> το οποίο διαθέτει μια κάμερα CCD με φίλτρο ανίχνευσης GFP ή το σύστημα Amersham ImageQuant 800 (Cytiva), ύστερα από έκθεση για 1-3 δευτερόλεπτα.

#### **6.10. Ανάλυση ανοσοαποτυπωμάτων κατά western (western blot)**

Πρωτεϊνικά δείγματα που είχαν αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία (SDS-PAGE) ή απουσία (native-PAGE) SDS, αναλύθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν αρχικά από την πηκτή σε μεμβράνη πολυβινυλιδενίου (polyvinylidene fluoride membranes, PVDF) (Merck), η οποία είχε

ενεργοποιηθεί με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε μεθανόλη για 15 δευτερόλεπτα, σε υπερκάθαρο νερό για 2 λεπτά και σε διάλυμα μεταφοράς (0.25 mM Tris-Base, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, pH 8.3) για 15 λεπτά. Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας διαφορά δυναμικού 25 V για 30 λεπτά σε ημι-στεγνές συνθήκες (semidry) χρησιμοποιώντας τη συσκευή Trans-Blot Turbo (BioRad Laboratories). Η μεμβράνη επώαστηκε με ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή 16 ώρες στους 4 °C σε διάλυμα γάλακτος 0,5% (w/v) σε Tris-buffered saline με 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST), προκειμένου οι πρωτεΐνες του γάλακτος να προσδεθούν και να καλύψουν όλα τα κενά τμήματα της μεμβράνης, εμποδίζοντας έτσι τη μετέπειτα μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων. Μετά από τρεις πλύσεις των δέκα λεπτών με TBST, η μεμβράνη επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το ανάλογο αντίσωμα το οποίο είχε διαλυθεί σε κατάλληλη συγκέντρωση σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST που περιείχε επιπλέον 0.5% (w/v) γάλα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: ένα μονοκλωνικό αντι-πολυιστιδινικό αντίσωμα επιμύος αντι-His σε αραίωση 1:3,000 συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP) (Sigma), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος αντι-GFP (Takara) σε αραίωση 1:20.000 ή ένα μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος αντι-FLAG (Sigma) σε αραίωση 1:2.500 και ως δευτερογενές αντίσωμα σε αυτές τις περιπτώσεις ένα αντι-mouse goat IgG συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP) σε αραίωση 1:4.000. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη πραγματοποιήθηκε τελικά μετά από τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBST χρησιμοποιώντας ένα από τα μηχανήματα ChemiDoc-It<sup>2</sup> Imaging System (UVP) ή Amersham ImageQuant 800 imaging system (Cytiva).

### **6.11. Μέτρηση φθορισμού σε πλακίδια 96 θέσεων**

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης σε κάθε περίπτωση μετρήθηκε ο φθορισμός ίσου όγκου καλλιέργειών. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν 0.5 mL καλλιέργειας στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος PBS

(phosphate buffered saline, pH 7.4). Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε μαύρο πλακίδιο 96 θέσεων (96-well plate) και ανιχνεύθηκε το επίπεδο φθορισμού της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) η οποία εκφράζεται ενωμένη με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες στα 510 nm, ύστερα από διέγερση του φθοροφόρου στα 488 nm. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν τα φθορισμόμετρα TECAN SAFIRE<sup>2</sup> και Cytation 5 (Bio Tek) που ήταν συμβατά με πλακίδια 96 θέσεων.

### **6.12. Ανάλυση φθορισμού με χρήση κυτταρομετρίας ροής**

Η μελέτη του φθορισμού μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων που παράγουν μεμβρανικές πρωτεΐνες ενωμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, χρησιμοποιώντας το μηχάνημα CyFlow ML (Partec). Συγκεκριμένα απομονώθηκαν περίπου  $10^7$  κύτταρα τα οποία επαναιωρήθηκαν σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ο φθορισμός ανά κύτταρο για 50.000 από αυτά ανιχνεύθηκε στα 530/30 nm ύστερα από διέγερση του φθοροφόρου στα 488 nm. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό FlowJo 7.6.2.

### **6.13. Απομόνωση και ποσοτικοποίηση της δέλτα-ροδοψίνης του οργανισμού *Haloterrigena turkmenica* (HtdR) από βακτηριακές μεμβράνες**

Η δέλτα-ροδοψίνη HtdR υπερεκφράστηκε σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxR, SuptoxR2.1 και SuptoxR2.2, καθώς και σε MC1061 χωρίς και με την ταυτόχρονη συνέκφραση της πρωτεΐνης RraA από τους οργανισμούς *E. gergoviae* ή *A. thaliana*, σε όγκο καλλιέργειας 250 mL ή στις περιπτώσεις στις οποίες η πρωτεΐνη που παράγεται θα απομονωνόταν επιπλέον με διαδοχικές μεθόδους χρωματογραφίας σε 1 L. Επιπλέον παράχθηκε στα δέκα διαφορετικά ENS134-XX στελέχη που φέρουν γενετικές απαλοιφές της RNάσης E, σε όγκο καλλιέργειας 150 mL. Η καλλιέργεια που προέκυψε μετά τη διαδικασία της υπερέκφρασης φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 10 λεπτά, το θρεπτικό υλικό απορρίφθηκε, και το ίζημα που περιείχε το βακτηριακό

πληθυσμό επαναιωρήθηκε σε 7.5 mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15% γλυκερόλη, 2 mM διθειοθρεϊτόλη, pH 7.5) στη πρώτη περίπτωση ή σε 9 mL διαλύματος PBS (pH 7.4) στη δεύτερη. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε ενώ τα εναιωρήματα βρίσκονταν σε πάγο, με χρήση υπερήχων που εφαρμόστηκαν σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, η ροδοψίνη εξήχθη από τα δείγματα με προσθήκη του επιφανειοενεργού DDM σε συγκέντρωση 2.5 % (w/v) και του αναστολέα των πρωτεασών PMSF σε συγκέντρωση 0.1 mM, και επώαση υπό ανάδευση (180 rpm) σε συνθήκες σκότους για 24 ώρες στους 4 °C. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα δείγματα υπερφυγοκεντρήθηκαν σε έναν ρότορα 70Ti (Beckman) στις 42.000 rpm (130.000 g) στους 4 °C για 1 ώρα. Εφόσον το ίζημα που δημιουργήθηκε σε κάθε περίπτωση είχε αποχρωματιστεί πλήρως και το σύνολο της μωβ ροδοψίνης είχε εξαχθεί από τις μεμβράνες επιτυχώς, συλλέχθηκε το έγχρωμο υπερκείμενο και αναλύθηκε περαιτέρω με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550 nm (OD<sub>550</sub>).

#### **6.14. Απομόνωση της ροδοψίνης HtdR με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και χρωματογραφίας μοριακής διήθησης**

Η μεμβρανική πρωτεΐνη HtdR που παράχθηκε σε βακτηριακά κύτταρα MC1061, SuptoxR και SuptoxR2.2, απομονώθηκε συνδυαστικά με χρωματογραφία συγγένειας (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) και χρωματογραφία μοριακής διήθησης (size exclusion chromatography, SEC). Μετά τη διαδικασία εξαγωγής της HtdR από τις κυτταρικές μεμβράνες όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.13, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας σε μηχανήμα ÄKTA start (GE Healthcare) με στήλη HisTrap (GE Healthcare) χωρητικότητας 5 mL. Η στήλη περιείχε από τον κατασκευαστή ακινητοποιημένα κατιόντα νικελίου (Ni<sup>2+</sup>) στα οποία μπορεί και προσδένεται το επίτοπο 6 ιστιδινών (6His tag) που εκφράζεται στο N-τελικό άκρο της μεμβρανοπρωτεΐνης. Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιήθηκε με 25 mL διαλύματος εξισορρόπησης που περιείχε 300 mM NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (w/v) DDM με pH 8. Το κλάσμα στο οποίο βρισκόταν διαλυτοποιημένη η πρωτεΐνη που είχε προηγουμένως

εξαχθεί από τις μεμβράνες με χρήση του επιφανειοενεργού DDM, φορτώθηκε στη στήλη, και ξεπλύθηκε αρχικά με 75 mL διαλύματος εξισορρόπησης, και στη συνέχεια με 7.5 mL του ίδιου διαλύματος, το οποίο περιείχε επιπλέον 100 mM ιμιδαζολίου. Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη πραγματοποιήθηκε με 10 mL διαλύματος έκλουσης (200 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (w/v) DDM, pH 8). Η συνολική ποσότητα της έκλουσης συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 600  $\mu$ L με χρήση φυγοκεντρικού φίλτρου συμπύκνωσης Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore), το οποίο δεν επέτρεπε τη διέλευση πρωτεϊνών μεγαλύτερων από 10 kDa. Στη συνέχεια, το δείγμα καθαρίστηκε περαιτέρω με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης σε μηχανήμα ÄKTA pure που έφερε στήλη Superdex 200 (GE Healthcare), η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα PBS (pH 7.4) στο οποίο είχε επιπλέον προστεθεί DDM σε συγκέντρωση 0.1% (w/v). Η ποσοτικοποίηση της απομονωμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm χρησιμοποιώντας το ειδικό πλακίδιο (Take 3) στο μηχανήμα Cytation 5 (BioTek), και η τελική συγκέντρωση εκτιμήθηκε με βάση το συντελεστή μοριακής απορρόφησης της πρωτεΐνης HtdR (extinction coefficient,  $\epsilon_{280} = 2.15(\text{mg/mL}) \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **6.15. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με μέτρηση φθορισμού (FSEC)**

Η μεμβρανική πρωτεΐνη BR2-GFP παράχθηκε σε βακτηριακά κύτταρα SuptoxR2.1, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.5, με τελικό όγκο καλλιέργειας το 1 λίτρο. Μετά το πέρας της μεμβρανοπρωτεϊνικής υπερέκφρασης, ο κυτταρικός πληθυσμός συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα που δημιουργήθηκε, επαναιωρήθηκε σε 7.5 mL PBS και η διάρρηξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων που εφαρμόστηκαν για μικρά διαδοχικά διαστήματα ενώ ταυτόχρονα το δείγμα ψυχόταν σε πάγο. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 10.000 rpm για 30 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθούν τα κυτταρικά θραύσματα και το υπερκείμενο υπεβλήθη σε υπερφυγοκέντρηση στις 42.000 rpm (130.000 g), στους 4 °C για 1 ώρα, χρησιμοποιώντας τον ρότορα 70Ti (Beckman). Το

μεμβρανικό ίζημα συλλέχθηκε και επαναιωρήθηκε σε 8.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος διαλυτοποίησης (10 mM HEPES pH 7.4, 400 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1.5% (w/v) DDM, 0.12 mM PMSF) με συνεχή ομαλή ανάδευση στις 180 rpm στους 4 °C για 1 ώρα. Το επαναιωρημένο δείγμα αναλύθηκε στη συνέχεια με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (size exclusion chromatography, SEC) χρησιμοποιώντας ένα μηχάνημα ÄKTA pure (GE Healthcare) με στήλη Superdex 200, στο οποίο είχε συνδεθεί ο ανιχνευτής φθορισμού RF-20A (Shimadzu). Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 10 mM HEPES (pH 7.4), 400 mM NaCl και 0.05% (w/v) DDM. Τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στις φθορίζουσες κορυφές αναλύθηκαν περαιτέρω σε πηκτική πολυακρυλαμίδου σε εγγενείς συνθήκες (native PAGE) και ανιχνεύθηκαν με μέτρηση του ενδοπηκτικού φθορισμού (in-gel fluorescence) και με ανοσοαποτύπωμα κατά western (western blotting).

#### **6.16. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Το σύνολο των γραφημάτων που παρουσιάζονται στη διδακτορική διατριβή δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Prism 7.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των προγραμμάτων Prism 7.00 και Microsoft Office 365 Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Η σύγκριση των μέσων τιμών των διαφορετικών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε με t-test για ανεξάρτητα δείγματα (unpaired t-test). Τα δεδομένα που απεικονίζονται σε όλα τα γραφήματα αντιστοιχούν στη μέση τιμή από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα, κάθε ένα εκ των οποίων εκτελέστηκε σε τρεις επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν σε  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (standard error of mean). Οι διαφορές των μέσων τιμών μεταξύ των δειγμάτων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν το *p*-value ήταν μικρότερο ή ίσο του 0.05.

## 6.17. Πρωτεομική ανάλυση

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν αρχικά για ανάλυση του συνολικού πρωτεϊνικού προφίλ ήταν MC1061 *E. coli* κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί είτε με ένα μεμονωμένο πλασμίδιο (pBAD33, pBAD33-RraA, pBAD33-RraB), είτε με ένα από τα τρία pBAD33 πλασμίδια συνδυαστικά με ένα ακόμη που κωδικοποιούσε μια από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν (pASK-BR2-GFP, pASK-YidC-GFP), καταλήγοντας σε εννέα συνδυασμούς. Τα βακτηριακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν και έγινε επαγωγή της πρωτεϊνικής υπερέκφρασης, όπως περιγράφεται παραπάνω σε όγκο καλλιέργειας ίσο με 5mL. Μετά το πέρας της διαδικασίας της υπερέκφρασης, συλλέχθηκαν τα κύτταρα κάθε καλλιέργειας με φυγοκέντρηση στα 4000 rpm. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές για την απόκτηση τριών βιολογικών επαναλήψεων. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν σε έναν φασματογράφο μάζας και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με χρήση του λογισμικού Perseus 1.6.15.0.

## **Παραρτήματα**

## 7. Παραρτήματα

7.1. Νουκλεοτιδικές ακολουθίες των ομόλογων *rraA* γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες αμινοξικές ακολουθίες που κωδικοποιούνται από αυτά:

### *Escherichia coli*

ATGAAATACGATACTTCCGAGCTTTGTGACATCTATCAAGAAGATGTTAACGTCGTG  
GAACCGCTGTTCTCCAACCTTTGGCGGACGGGCGTCGTTTGGCGGACAAATAATCAC  
GGTAAAATGTTTCGAGGACAACGGGTGTGCTGTACGATCTGCTCGAACAGAATGGCC  
GTGGTCGTGTTCTTGTCTCGATGGCGGTGGTTCTGTTTCGTCTCGCGCACTGGTCGATG  
CTGAACTGGCGCGTCTGGCAGTACAAAATGAATGGGAAGGTCTGGTCATTTACGGC  
GCGGTGCGTCAGGTAGATGACCTGGAAGAGTTGGATATCGGCATCCAGGCGATGGC  
GGCAATTCCGGTTGGTGCCGCTGGCGAAGGCATTGGCGAAAGCGATGTCCGCGTCA  
ATTTTGGCGGTGTCACCTTCTTCTCCGGCGACCATCTTTATGCCGACAATACCGGGA  
TTATTCTTTCAGAAGATCCGCTGGATATTGAATGA

MKYDTSELCDIYQEDVNVVEPLFSNFGGRASFGGQIITVKCFEDNGLLYDLLEQNGRGR  
VLVVDGGGSVRRALVDAELARLAVQNEWGLVIYGAVRQVDDLEELDIGIQAMAAIP  
VGAAGEGIGESDVRVNFGGVTFFSGDHLIYADNTGIILSEDPLDIES

### *Klebsiella pneumoniae*

ATGAAATACGATACTTCCGAGCTTTGTGACATCTACCAGGAAGATGTCAACGTCGT  
GGAACCGCTGTTCTCTAACTTTGGAGGACGGTCGTCGTTTGGTGGACAGATCATTAC  
GGTTAAATGTTTCGAGGATAACGGGTGTGCTCTACGATCTGCTCGAGCAGAATGGCC  
GTGGTCATATTCTCCTGATCGATGGCGGCGGCTCAGTACGACGCGCGTTAATTGACG  
CTGACCTGGCGCGTCTGGCCGTCCAGAATGAATGGGAAGGGTTGGTGGTCTATGGC  
GCGGTGCGCCAGGTTGACGACCTTGAGGAGCTGGACATTGGTATTCAGGCGCTGGC  
GGCTATTCCGGTCGGCGCGGCTGGCGAAGGCATCGGCGAAAGCGACGTGCGCGTCA  
ATTCGGCGGGGTGACTTTCTTCTCCGGCGACCATCTGTATGCCGATAACACCGGGA  
TGATCCTGTCTCGGAAGACCCGCTGGATATCGAATAA

MKYDTSELCDIYQEDVNVVEPLFSNFGGRSSFGGQIITVKCFEDNGLLYDLLEQNGRGH  
ILLIDGGGSVRRALIDADLARLAVQNEWEGLVVYGAVRQVDDLEELDIGIQALAAIPVG  
AAGEGIGESDVRVNFGGVTFFSGDHLIYADNTGMILSEDPLDIES

*Enterobacter gergoviae*

ATGAAATACGATACATCCGAGCTTTGCGACATCTACCAGGAAGATGTCAATGTCGT  
TGAACCGCTGTTCTCCAACCTTTGGCGGACGGTCGTCGTTTGGTGGACAGATCATTAC  
GGTGAAGTGTTTCGAGGACAACGGGCTACTGTACGATATGCTCGAAGAGAACGGCC  
GTGGCCGCATTCTGCTGGTCGACGGCGGTGGCTCCGTGCGCCGGGCGCTGATTGAC  
GCCGATCTCGGCAAGCTGGCGGTGCAGAACGAATGGGAAGGGATCGTGGTCTACG  
GCGCGGTGCGCCAGGTGGACGATCTTGAAGAGCTTGACCTGGGGATCCAGGCGCTG  
GCGGCCATTCCGGTGGGGGCCGCGGGCGAAGGCATCGGCGAGAGCGATGTACGCG  
TTAACTTCGGCGGCGTCACCTTCTTCTCCGGCGATCATCTGTATGCCGACAATACCG  
GCATTATCCTCTCGGAAGACGCGCTCGATATCGAATAA

MKYDTSELCDIYQEDVNVVEPLFSNFGGRSSFGGQIITVKCFEDNGLLYDMLEENGRGR  
ILLVDGGGSVRRALIDADLGKLAVQNEWEGIVVYGAVRQVDDLEELDLGIQALAAIPV  
GAAGEGIGESDVRVNFGGVTFFSGDHLIYADNTGIILSEDALDIES

*Providencia stuartii*

ATGAAATATGATACTTCCGAACCTCTGTGATATCTACCAAGAAAGCGTCAATGTGGT  
AGAGCCTCTCTTTTCCAACCTTTGGTGGACGTAATTCATTTGGCGGTCAAATCATTAC  
GGTCAAGTGCTTTGAAGACAATGGCCTACTATATGATTTGCTGGAAGAAGACGGTC  
ATGGTCGTATTCTCCTTGTCGATGGTGGCGGCTCTGTACGCAAAGCCCTCATTGATG  
CGGAACTTGCTCGCTTAGCCGTTGATAACCACTGGGAAGGTATTGTGGTTTATGGCG  
CTGTACGCCAAGTAGACGCATTGATGGAGTTAGATCTGGGTATTCAAGCAATTGCC  
GCCATACCGGCAGGCTGCCAGATGAAGGTATTGGCGAAAGCGATATTCGCGTCAA  
TTTTGGCGGCGTTACCTTCTTCTCGGGTGACTATCTCTATGCAGATAACACAGGCAT  
CATCTTATCAGAAGAACCACTTTCAACTCAGGATGGTAGCGAGTTTGAAGTACTAG  
ACGACGACCTCTAA

MKYDTSELCDIYQESVNVVEPLFSNFGGRTSFGGQIITVKCFEDNGLLYDLLEEDGHGRI  
LLVDGGGSVRKALIDAEALARLAVDNHWEGIVVYGAVRQVDALMELDLGIQAIAAIPAG  
CPDEGIGESDIRVNFGGVTFFSGDLYADNTGIILSEEPLSTQDGSEFEVLDDDL

*Enterobacter cloacae*

ATGAAATACGATACCTCCGAGCTTTGTGACATCTACCAGGAAGATGTCAACGTCGT  
TGAACCGCTGTTCTCCAACCTTTGGTGGACGGTCTTCGTTTGGCGGACAAATCATCAC  
GGTGAAATGTTTCGAGGATAACGGGTTGCTGTACGATCTGCTCGAACAGAACGGTC  
GTGGTCGCGTGCTGCTGGTTGATGGCGGGCGGCTCCGTACGTCTGCATTGATTGACG  
CGGAACTGGCCGGAATTGCCGTGCAAAACGAATGGGAAGGCATTGTGGTCTACGGT  
TCAGTCCGCCAGGTGGACGATCTCGAAGACCTCGATATCGGCATTCAGGCGATTGC  
CGCCATTCCGGTAGGCGCCGCGGGTGAAGGCATTGGCGAAAGCGATATTCGCGTCA  
ATTCGGCGGCGTGACCTTCTTCTCCGGCGACCATCTCTATGCCGATAACACCGGCA  
TTATCCTCTCCGAAGATCCGCTGGATATTGAGTAG

MKYDTSELCDIYQEDVNVVEPLFSNFGGRSSFSGGQIITVKCFEDNGLLYDLLEQNNGRGR  
VLLVDGGGSVRRALIDAELAGIAVQNEWEGIVVYGSVRQVDDLEDLDIGIQAIAAIPVG  
AAGEGIGESDIRVNFGGVTFFSGDHLADNTGIILSEDPLDIES

*Serratia marcescens*

ATGAAATACGATACTTCCGAACCTTTGCGACATCTATCATGAAGAGGTGAACGTTGTT  
GAACCTCTGTTCTCCAATTTTGGCGGGCGTACTTCATTTGGCGGGCAGATCACCACG  
GTGAAATGCTTTGAGGATAACGGCCTGTTATTCGATCTGCTTGAAGAAAACGGCCG  
CGGCCGCGTGCTGTTGGTCGACGGCGGGCGGTTTCGGTTCGCCGGGGCGCTGATCAACG  
CCGAACTGGCGCGCCTGGCCGCCCAGAACGAATGGGAAGGCATCGTGGTGTACGGC  
GCGGTGCGCCAGGTGGACGATCTGGAAGAGCTCGACATCGGCATTCAGGCGATGGC  
GGCGATCCCGGCGGGTGCCGTAAGCGAAGGCGTGGGCGAAAGCGATATCCGCGTC  
AACTTCGGTGGCGTCACCTTCTTCTCCGGCGATCACCTGTATGCCGACAACACCGGC  
ATCATCCTCTCCGAAGACCCGCTCGACATCGAGTGA

MKYDTSELCDIYHEEVNVVEPLFSNFGGRTSFGGQITTVKCFEDNGLLFDLLEENGRGR  
VLLVDGGGSVRRALINAELARLAAQNEWEGIVVYGAVRQVDDLEELDIGIQAMAAIPA  
GAVSEGVGESDIRVNFGGVTFFSGDHLADNTGIILSEDPLDIES

*Acinetobacter baumannii*

ATGGACGGTAAGTTCTTTAAAAGTTATGGCGCACGTCAAACCTTTTGGCGGACAAGT  
TGTGACTGTAAAGTGTTTTGAAGATAACTCGCGTGTAAGAGATTATTGGCTACAG  
ATGGTACAGGGAAGGTATTGGTTGTGGATGGTGGTGCTTCAATGCGCTGTGCACTT  
ATGGGAGATATGATTGCGGAATCAGCTGTAAAAATAACTGGAATGGTGTGGTTAT  
TTATGGCTGTGTACGTGATGTTGATGCACTTGCAACCTTAGATTTAGGTGTACATGC  
ATTGGCTGCAATTCCGCAAAAAAGTAACCGTAAGGGCATTGGTGAAGTAGATATTC  
CTTTGTATTTTGGTGGAGTCACAATTCAATCTGGTGATTTTATCTATGCAGATAATA  
ATGGAATTGTGATTGCTAAAGAAAACTAGTCTAG

MDGKFFKSYGARQTFGGQVVTVKCFEDNSRVKELLATDGTGKVLVVDGGASMRCL  
MGDMIAESAVKNNWNGVVIYGCVRDVALATLDLGVHALAAIPQKSNRKGIGEV  
DIP  
LYFGGVTIQSGDFIYADNNGIVIAKEKLVS

*Proteus mirabilis*

ATGAAATATGATACTTCTGAACTCTGTGATATCTATCAAGAAGATATCAATGTCGTA  
GAACCGCTTTTCTCAAACCTTTGGTGGTCGTAGCTCTTTTGGTGGACAAATTACCACT  
GTCAAATGTTTTGAAGATAATGGTCTGCTTTATGACTTACTAGAAGAAAACGGTAA  
AGATCGTATTCTATTAGTTGATGGCGGAGGCTCTGTCCGCAAAGCGCTAGTCGACG  
CTGAATTGGCGCAACTGGCGGTACTCAACGAATGGGAAGGTATTGTTGTTTATGGT  
GCAGTACGCCAAGTGGACGCTTTATCTGAGCTTGATTTAGGCATTCAAGCGATGGCT  
GCCATTCCTGCAGGTTGCCCAAGTGAAGGCATCGGCGACAGTGATATCCGCGTAAA  
CTTTGGTGGTGTACTTTCTTCTCCGGTGATTATCTTTATGCTGATAATACTGGCATT  
ATCTTATCTGAAGAGCCTTTAGGCTTAGATGATGACGATTTAGATGATGATTTATTA  
GAAGAATAA

MKYDTSELCDIYQEDINVVEPLFSNFGGRSSFQITTVKCFEDNGLLYDLLEENGKDRI  
LLVDGGGSVRKALVDAELAQLAVLNEWEGIVVYGAVRQVDALSELDLGIQAMAAIPA  
GCPSEGIGDSDIRVNFSGGVTFSGDYLYADNTGIILSEEPLGLDDDDLDLDDDLLEES

*Arabidopsis thaliana*

(Codon optimized γονίδιο)

ATGGCATTGTGTTACCACAGCCGAAGTTTGTGATGCAAACCAAGAAATGATTCGTAG  
CGGTCAGCTGCGTGCCCTGCAGCCGGTTTTTCAGATTTATGGTCGTCGTCAGATTTT  
TAGCGGTCCGGTTGTTACCGTTAAAGTGTTTGAAGATAATGGCCTGATTCGCCACTT  
TCTGGAAGAAAAAGGTAATGGTCGTGTTCTGGTTGTTGATGGTGGTGGTAGCCTGC  
GTTGTGCAATTTTAGGTGGTAATCCGGTTGTGCAGGCACAGAATAATGGTTGGGCA  
GGTATTATTGTGAATGGCTGTATTCGTGATGTGGATGAAATTAACGGTTGCGATATT  
GGTGTTTCGTGCACTGGCAAGCCATCCGATTAAAGCAAGCAAAAAAGGTCTGGGTGA  
ACAGCGTGTTAGCCTGAATATTGCAGGTACACGTATTTGTGATGGCGAGTGGCTGT  
ATGCAGATACCGATGGTATTCTGGTTAGCCAGATTGAACTGAGCGTTTAA

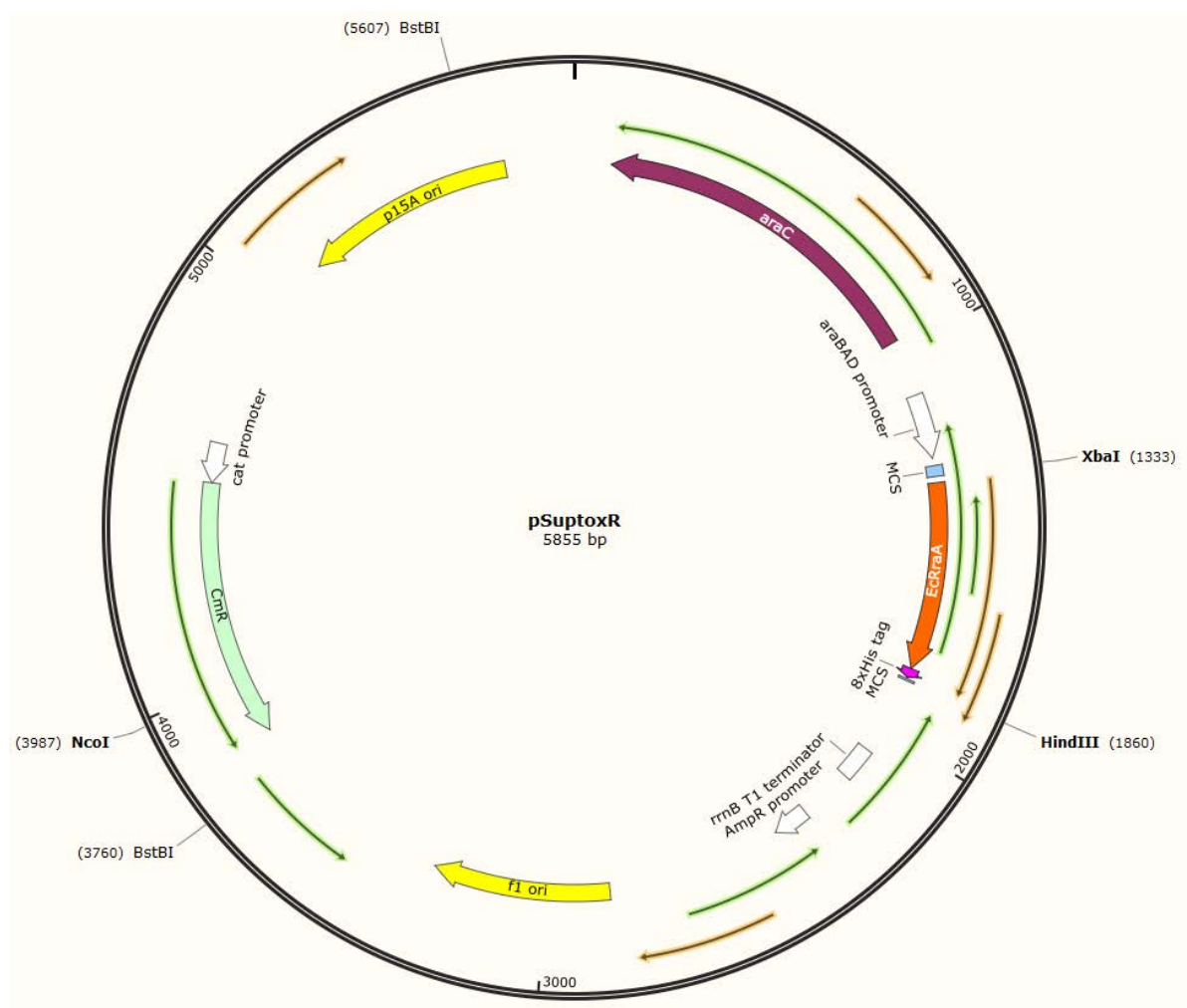
MAFVTTAEVCDANQEMIRSGQLRALQPVFQIYGRRQIFSGPVVTVKVFEDNGLIRHFLE  
EKNGRVLVVDGGGSLRCAILGGNPVVQAQNNGWAGIIVNGCIRDVDEINGCDIGVRA  
LASHPIKASKKGLGEQRVSLNIAGTRICDGEWLYADTDGILVSQIELSVS

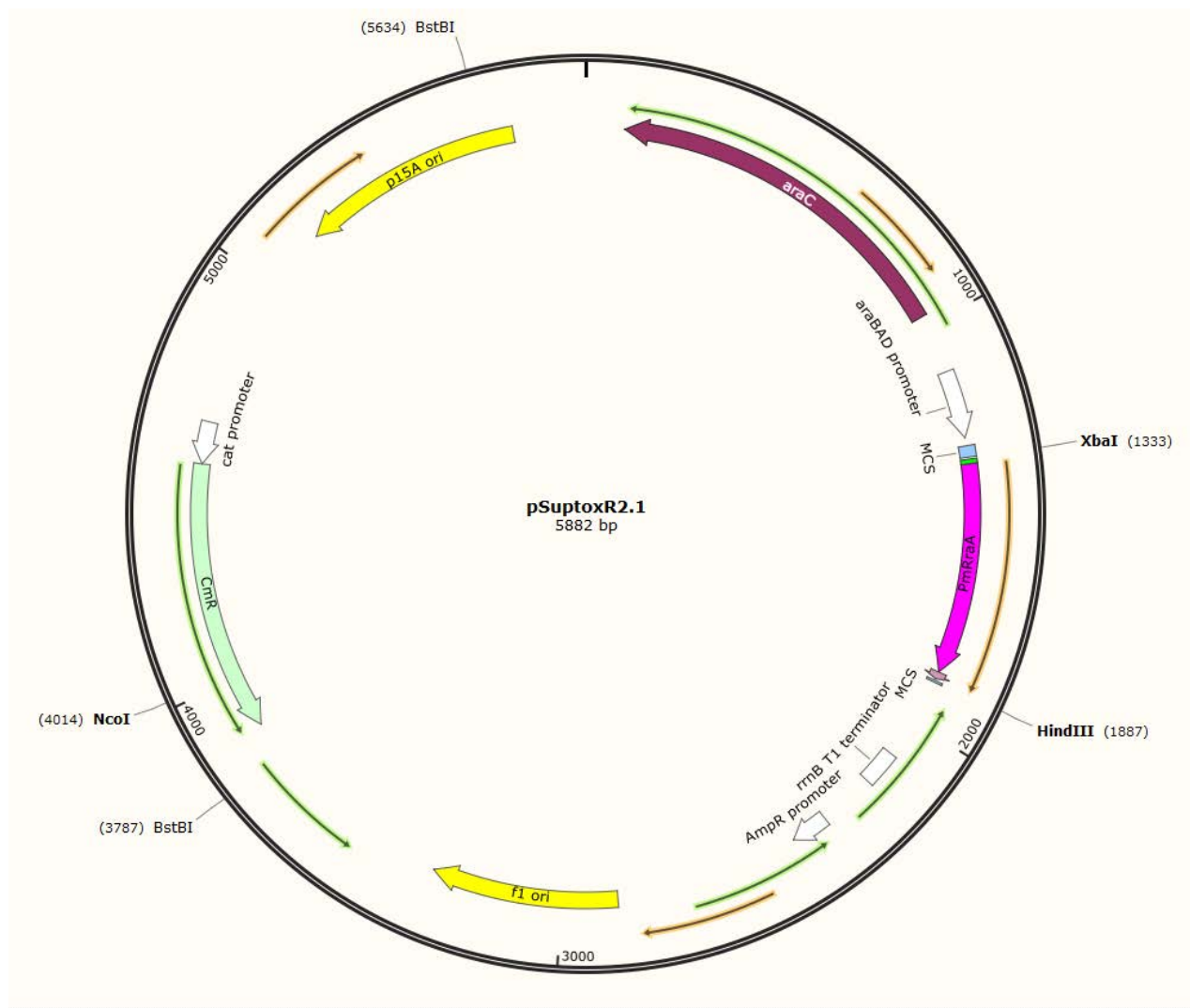
*Malus domestica*

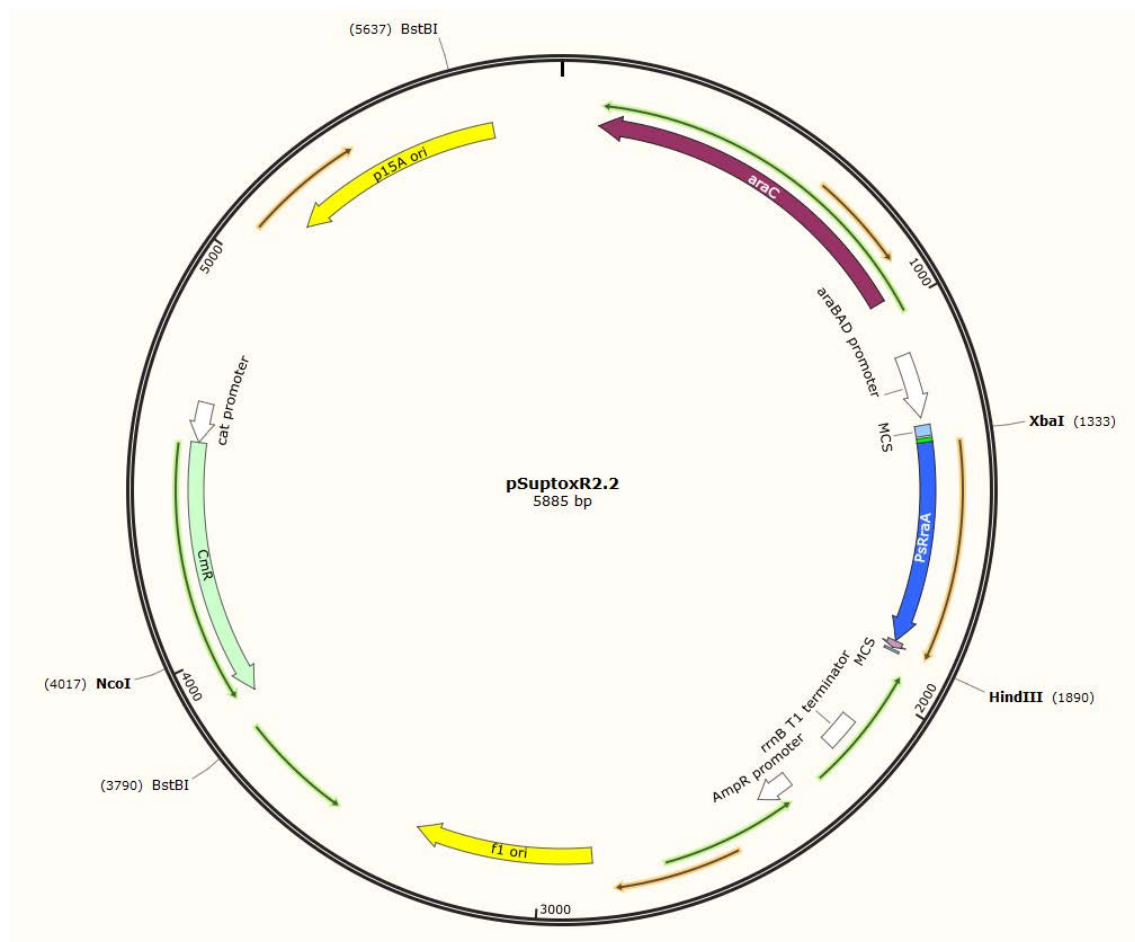
ATGGCCTTGGTTACAACCTGCTGAAGTTTGCGATGCGCACTCTCAGTTGATTGGGAGT  
GGTGATCTTCGGGTGCTTGAGCCAATATTCCAGATATATGGCCGGCGACAGGTCTTC  
TCTGGACAAATAGTTACCTTAAAGGTRTTTGAAGACAATGTCCTCGTTCGTTCTTT  
CTCGAGGAGAAAGGCAATGGAAGAGTTCTTGTTGTGGACGGAGGTGGAAGCAAGC  
GGTGTGCAATATTGGGAGGCAACCCTGTGGTTCAAGCTCAGAATAACGGCTGGGCA  
GGTATAGTGGTCAATGGCTGCATAAGAGATGTGCGACGAGATTAACGGTTGCGACAT  
TGCGGTGAGAGCTCTGGCGGCCCATCCCATGAAAGCCAACAAGAAAGGGATCGGC  
GAGAAGCAGGTACCAATAAGCATTGCCGGGACAAGGATCTGTGACGGGGAATGGC  
TTTATGCAGACACCGATGGAATATTGATTTCTCGTACCGAGTTATCTGTCTGA

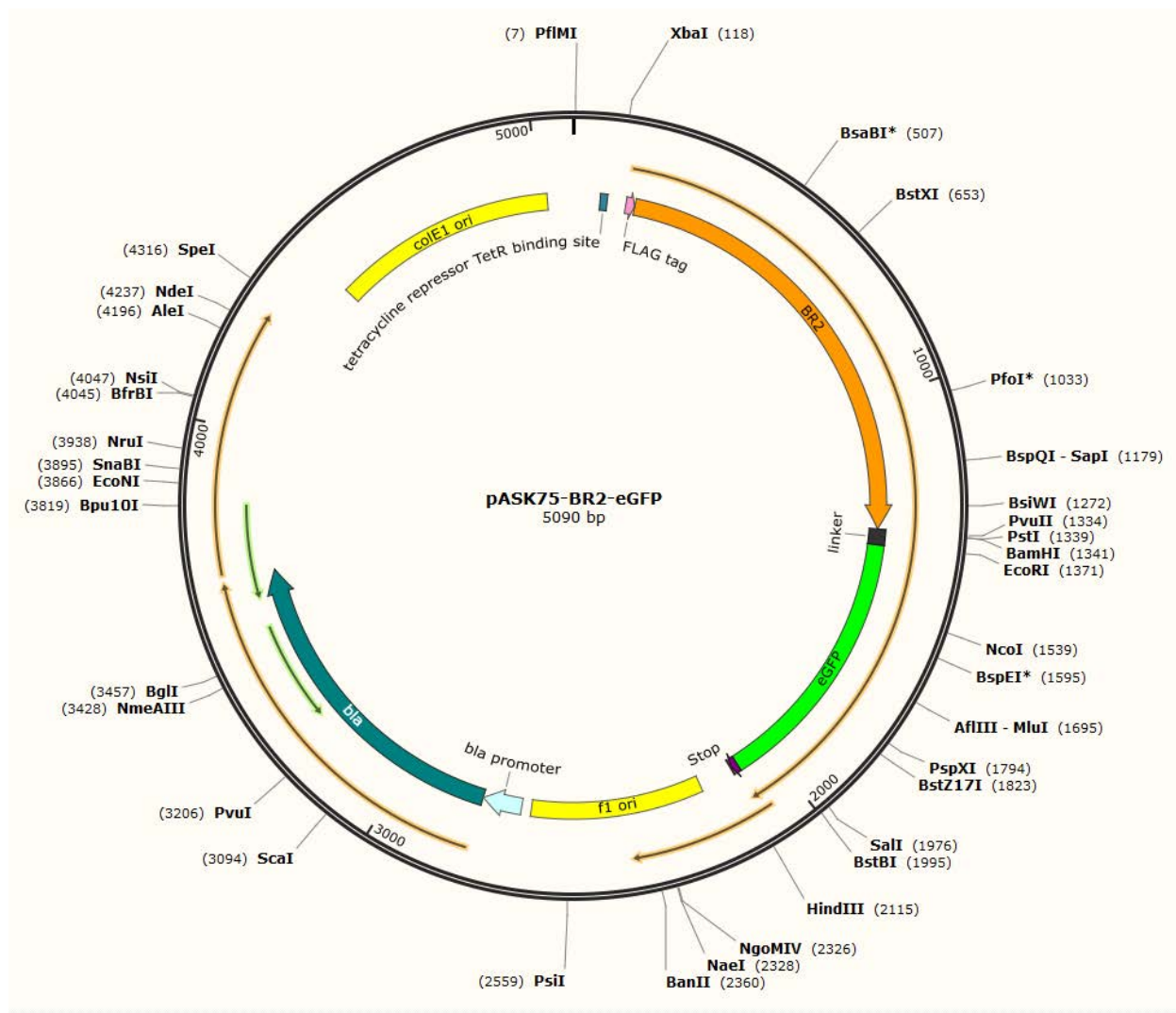
MALVTTAEVCDHAHSQLIGSGDLRVLEPIFQIYGRRQVFSGQIVTLKXFEDNVLVRSFLEE  
KNGRVLVVDGGGSKRCAILGGNPVVQAQNNGWAGIVVNGCIRDVDEINGCDIGVRA  
LAAHPMKANKKGIGEKQVPISIAGTRICDGEWLYADTDGILISRTELSV

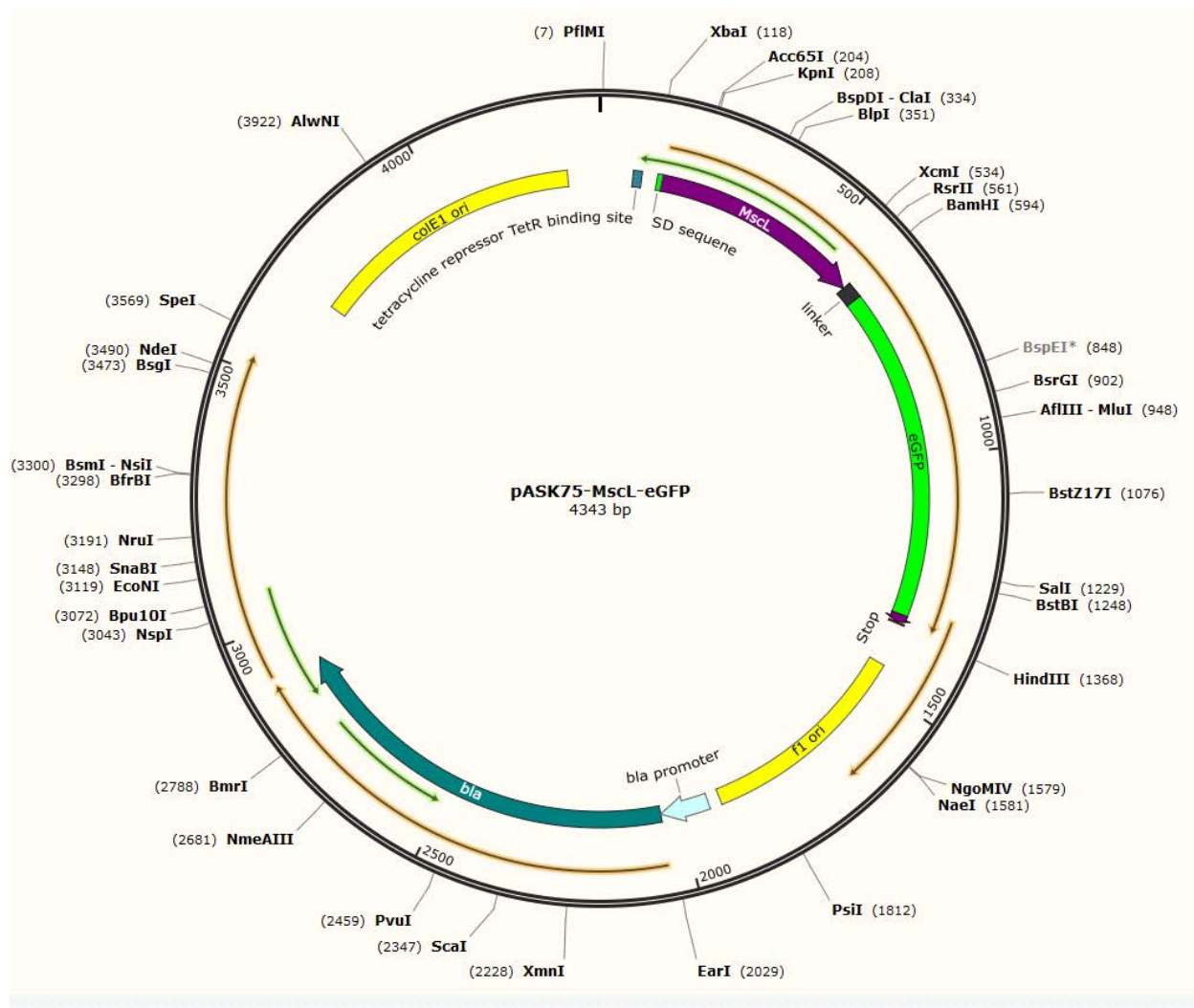
## 7.2. Πλασμιδιακοί χάρτες

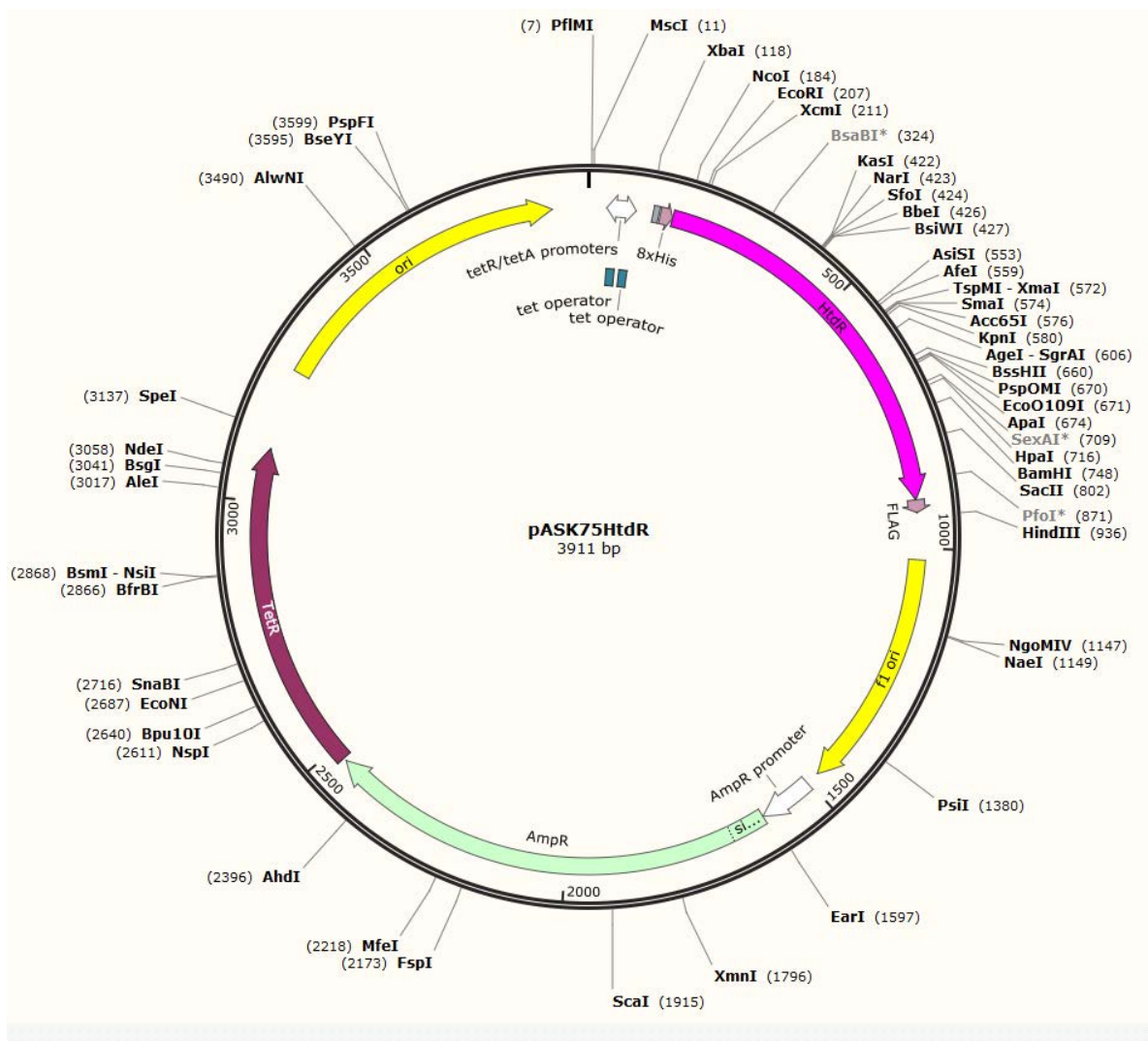














## 8. Βιβλιογραφικές αναφορές

- Adams, H., Scotti, P.A., De Cock, H., Luirink, J., and Tommassen, J. (2002). The presence of a helix breaker in the hydrophobic core of signal sequences of secretory proteins prevents recognition by the signal-recognition particle in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 269(22), 5564-5571. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03262.x.
- Ahn, M., Song, M., Oh, E., Jamal, A., Kim, H., Ko, K., et al. (2008). Production of therapeutic proteins with baculovirus expression system in insect cell. *Entomological Research*, S71-S78. doi: doi.org/10.1111/j.1748-5967.2008.00177.x.
- Albers, R.W. (1999). "Phospholipid Bilayers," in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition*, ed. A.B. Siegel GJ, Albers RW, et al. (Phospholipid Bilayers).
- Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C.M., Bruni, C.B., and Carlomagno, M.S. (1994). Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes Dev* 8(24), 3021-3031. doi: 10.1101/gad.8.24.3021.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., and Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 10(12), 6235-6254. doi: 10.3390/ijerph10126235.
- Almeida, J.G., Preto, A.J., Koukos, P.I., Bonvin, A., and Moreira, I.S. (2017). Membrane proteins structures: A review on computational modeling tools. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859(10), 2021-2039. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.07.008.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215(3), 403-410. doi: Doi 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Andrell, J., and Tate, C.G. (2013). Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Mol Membr Biol* 30(1), 52-63. doi: 10.3109/09687688.2012.703703.
- Anghel, S.A., McGilvray, P.T., Hegde, R.S., and Keenan, R.J. (2017). Identification of Oxal Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep* 21(13), 3708-3716. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.006.
- Angius, F., Iliaia, O., Amrani, A., Suisse, A., Rosset, L., Legrand, A., et al. (2018). A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Sci Rep* 8(1), 8572. doi: 10.1038/s41598-018-26668-y.

- Arachea, B.T., Sun, Z., Potente, N., Malik, R., Isailovic, D., and Viola, R.E. (2012). Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. *Protein Expr Purif* 86(1), 12-20. doi: 10.1016/j.pep.2012.08.016.
- Avram, S., Halip, L., Curpan, R., and Oprea, T.I. (2023). Novel drug targets in 2022. *Nat Rev Drug Discov* 22(6), 437. doi: 10.1038/d41573-023-00068-y.
- B.S. Barker, G.T.Y., C.H. Soubrane, G.J. Stephens, E.B. Stevens, M.K. Patel (2017). "Ion channels," in *Conn's Translational Neuroscience*, ed. P.M. Conn. (US: Elsevier), 11-43.
- Baumgarten, T., Schlegel, S., Wagner, S., Low, M., Eriksson, J., Bonde, I., et al. (2017). Isolation and characterization of the E. coli membrane protein production strain Mutant56(DE3). *Sci Rep* 7, 45089. doi: 10.1038/srep45089.
- Baumgarten, T., Ytterberg, A.J., Zubarev, R.A., and de Gier, J.W. (2018). Optimizing Recombinant Protein Production in the Escherichia coli Periplasm Alleviates Stress. *Appl Environ Microbiol* 84(12). doi: 10.1128/AEM.00270-18.
- Bawa, Z., Bland, C.E., Bonander, N., Bora, N., Cartwright, S.P., Clare, M., et al. (2011). Understanding the yeast host cell response to recombinant membrane protein production. *Biochem Soc Trans* 39(3), 719-723. doi: 10.1042/BST0390719.
- Bayburt, T.H., and Sligar, S.G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett* 584(9), 1721-1727. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.024.
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., et al. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40), 15370-15375. doi: 10.1073/pnas.0808115105.
- Bernaudo, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., Boutigny, S., et al. (2011). Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS One* 6(12), e29191. doi: 10.1371/journal.pone.0029191.
- Blaszczyk, J., Gan, J., Tropea, J.E., Court, D.L., Waugh, D.S., and Ji, X. (2004). Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure* 12(3), 457-466. doi: 10.1016/j.str.2004.02.004.
- Boes, D.M., Godoy-Hernandez, A., and McMillan, D.G.G. (2021). Peripheral Membrane Proteins: Promising Therapeutic Targets across Domains of Life. *Membranes (Basel)* 11(5). doi: 10.3390/membranes11050346.
- Borowska, M.T., Dominik, P.K., Anghel, S.A., Kossiakoff, A.A., and Keenan, R.J. (2015). A YidC-like Protein in the Archaeal Plasma Membrane. *Structure* 23(9), 1715-1724. doi: 10.1016/j.str.2015.06.025.

- Bouvier, M., and Carpousis, A.J. (2011). A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol Microbiol* 82(6), 1305-1310. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07894.x.
- Callaghan, A.J., Aurikko, J.P., Ilag, L.L., Grossmann, J.G., Chandran, V., Kuhnel, K., et al. (2004). Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the Escherichia coli ribonuclease RNase E. *Journal of Molecular Biology* 340(5), 965-979. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.046.
- Callaghan, A.J., Marcaida, M.J., Stead, J.A., McDowall, K.J., Scott, W.G., and Luisi, B.F. (2005a). Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* 437(7062), 1187-1191. doi: 10.1038/nature04084.
- Callaghan, A.J., Redko, Y., Murphy, L.M., Grossmann, J.G., Yates, D., Garman, E., et al. (2005b). "Zn-link": a metal-sharing interface that organizes the quaternary structure and catalytic site of the endoribonuclease, RNase E. *Biochemistry* 44(12), 4667-4675. doi: 10.1021/bi0478244.
- Cao, G.J., and Sarkar, N. (1992). Identification of the gene for an Escherichia coli poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21), 10380-10384. doi: 10.1073/pnas.89.21.10380.
- Carpousis, A.J. (2007). The RNA degradosome of Escherichia coli: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual Review of Microbiology* 61, 71-87. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093440.
- Carpousis, A.J., Luisi, B.F., and McDowall, K.J. (2009). Endonucleolytic initiation of mRNA decay in Escherichia coli. *Prog Mol Biol Transl Sci* 85, 91-135. doi: 10.1016/S0079-6603(08)00803-9.
- Caruthers, J.M., Feng, Y.N., McKay, D.B., and Cohen, S.N. (2006). Retention of core catalytic functions by a conserved minimal ribonuclease E peptide that lacks the domain required for tetramer formation. *Journal of Biological Chemistry* 281(37), 27046-27051. doi: 10.1074/jbc.M602467200.
- Casadaban, M.J., and Cohen, S.N. (1980). Analysis of Gene-Control Signals by DNA-Fusion and Cloning in Escherichia-Coli. *J Mol Biol* 138(2), 179-207. doi: Doi 10.1016/0022-2836(80)90283-1.
- Celesnik, H., Deana, A., and Belasco, J.G. (2007). Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell* 27(1), 79-90. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.038.
- Chen, Y., Song, J., Sui, S.F., and Wang, D.N. (2003). DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA

- overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 32(2), 221-231. doi: 10.1016/S1046-5928(03)00233-X.
- Chidiac, P., Hebert, T.E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994). Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45(3), 490-499.
- Choy, B.C., Cater, R.J., Mancina, F., and Pryor, E.E., Jr. (2021). A 10-year meta-analysis of membrane protein structural biology: Detergents, membrane mimetics, and structure determination techniques. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1863(3), 183533. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183533.
- Clarke, D.J., Jacq, A., and Holland, I.B. (1996). A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a type III topology. *Mol Microbiol* 20(6), 1273-1286. doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02646.x.
- Craig, E.A., Huang, P., Aron, R., and Andrew, A. (2006). The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156, 1-21. doi: 10.1007/s10254-005-0001-0.
- Cuesta Bernal, J., El-Delik, J., Gottig, S., and Pos, K.M. (2021). Characterization and Molecular Determinants for beta-Lactam Specificity of the Multidrug Efflux Pump AcrD from *Salmonella typhimurium*. *Antibiotics (Basel)* 10(12). doi: 10.3390/antibiotics10121494.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6640-6645. doi: 10.1073/pnas.120163297.
- de Grip, W.J., and Ganapathy, S. (2022). Rhodopsins: An Excitingly Versatile Protein Species for Research, Development and Creative Engineering. *Front Chem* 10, 879609. doi: 10.3389/fchem.2022.879609.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318(6047), 618-624. doi: 10.1038/318618a0.
- Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N.A., Kudva, R., and Koch, H.G. (2014). The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Membr Biol* 31(2-3), 58-84. doi: 10.3109/09687688.2014.907455.
- Dilworth, M.V., Piel, M.S., Bettaney, K.E., Ma, P., Luo, J., Sharples, D., et al. (2018). Microbial expression systems for membrane proteins. *Methods* 147, 3-39. doi: 10.1016/j.ymeth.2018.04.009.

- Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D.J., and de Gier, J.W. (2006). Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat Methods* 3(4), 303-313. doi: 10.1038/nmeth0406-303.
- Drew, D., Slotboom, D.J., Friso, G., Reda, T., Genevaux, P., Rapp, M., et al. (2005). A scalable, GFP-based pipeline for membrane protein overexpression screening and purification. *Protein Sci* 14(8), 2011-2017. doi: 10.1110/ps.051466205.
- Drew, D.E., von Heijne, G., Nordlund, P., and de Gier, J.W.L. (2001). Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in Escherichia coli. *Febs Letters* 507(2), 220-224. doi: Doi 10.1016/S0014-5793(01)02980-5.
- Du, F., Liu, Y.Q., Xu, Y.S., Li, Z.J., Wang, Y.Z., Zhang, Z.X., et al. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact* 20(1), 189. doi: 10.1186/s12934-021-01680-6.
- Dubendorff, J.W., and Studier, F.W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219(1), 45-59. doi: 10.1016/0022-2836(91)90856-2.
- Dutta, T., and Deutscher, M.P. (2009). Catalytic properties of RNase BN/RNase Z from Escherichia coli: RNase BN is both an exo- and endoribonuclease. *J Biol Chem* 284(23), 15425-15431. doi: 10.1074/jbc.M109.005462.
- Egloff, P., Hillenbrand, M., Klenk, C., Batyuk, A., Heine, P., Balada, S., et al. (2014). Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(6), E655-662. doi: 10.1073/pnas.1317903111.
- Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438(7068), 578-580. doi: 10.1038/nature04394.
- Ernst, O.P., Lodowski, D.T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L.S., and Kandori, H. (2014). Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev* 114(1), 126-163. doi: 10.1021/cr4003769.
- Fratamico, M., P., and Smith, L., J. (2006). "Foodborne Infections and Intoxications," in *Foodborne Infections and Intoxications*, ed. S.L. Taylor. 3 ed (Elsevier), 205-258.
- Fromant, M., Blanquet, S., and Plateau, P. (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 224(1), 347-353. doi: 10.1006/abio.1995.1050.

- Gao, J., Lee, K., Zhao, M., Qiu, J., Zhan, X., Saxena, A., et al. (2006). Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol Microbiol* 61(2), 394-406. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05246.x.
- Ge, Y., Draycheva, A., Bornemann, T., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2014). Lateral opening of the bacterial translocon on ribosome binding and signal peptide insertion. *Nat Commun* 5, 5263. doi: 10.1038/ncomms6263.
- Geertsma, E.R., Groeneveld, M., Slotboom, D.J., and Poolman, B. (2008). Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15), 5722-5727. doi: 10.1073/pnas.0802190105.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C., and Kelley, W.L. (2007). The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol Microbiol* 66(4), 840-857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05961.x.
- Genevaux, P., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Kelley, W.L. (2001). The *djlA* gene acts synergistically with *dnaJ* in promoting *Escherichia coli* growth. *J Bacteriol* 183(19), 5747-5750. doi: 10.1128/JB.183.19.5747-5750.2001.
- Gerdes, S.Y., Scholle, M.D., Campbell, J.W., Balazsi, G., Ravasz, E., Daugherty, M.D., et al. (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* 185(19), 5673-5684. doi: 10.1128/JB.185.19.5673-5684.2003.
- Ghosh, S., and Deutscher, M.P. (1999). Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8), 4372-4377. doi: 10.1073/pnas.96.8.4372.
- Gialama, D., Delivoria, D.C., Michou, M., Giannakopoulou, A., and Skretas, G. (2017a). Functional Requirements for DjlA- and RraA-Mediated Enhancement of Recombinant Membrane Protein Production in the Engineered *Escherichia coli* Strains SuptoxD and SuptoxR. *J Mol Biol* 429(12), 1800-1816. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.003.
- Gialama, D., Kostelidou, K., Michou, M., Delivoria, D.C., Kolisis, F.N., and Skretas, G. (2017b). Development of *Escherichia coli* Strains That Withstand Membrane Protein-Induced Toxicity and Achieve High-Level Recombinant Membrane Protein Production. *ACS Synth Biol* 6(2), 284-300. doi: 10.1021/acssynbio.6b00174.
- Gorna, M.W., Pietras, Z., Tsai, Y.C., Callaghan, A.J., Hernandez, H., Robinson, C.V., et al. (2010). The regulatory protein RraA modulates RNA-binding and helicase activities of the *E. coli* RNA degradosome. *RNA* 16(3), 553-562. doi: 10.1261/rna.1858010.

- Green, E.R., and Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* 4(1). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
- Grodberg, J., and Dunn, J.J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170(3), 1245-1253. doi: 10.1128/jb.170.3.1245-1253.1988.
- Gromiha, M.M., and Ou, Y.Y. (2014). Bioinformatics approaches for functional annotation of membrane proteins. *Brief Bioinform* 15(2), 155-168. doi: 10.1093/bib/bbt015.
- Gubellini, F., Verdon, G., Karpowich, N.K., Luff, J.D., Boel, G., Gauthier, N., et al. (2011). Physiological response to membrane protein overexpression in E. coli. *Mol Cell Proteomics* 10(10), M111 007930. doi: 10.1074/mcp.M111.007930.
- Gulezian, E., Crivello, C., Bednenko, J., Zafra, C., Zhang, Y., Colussi, P., et al. (2021). Membrane protein production and formulation for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 42(8), 657-674. doi: 10.1016/j.tips.2021.05.006.
- Guna, A., and Hegde, R.S. (2018). Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control. *Curr Biol* 28(8), R498-R511. doi: 10.1016/j.cub.2018.02.004.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177(14), 4121-4130. doi: 10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995.
- Hamilton, S.R., and Zha, D. (2015). Progress in Yeast Glycosylation Engineering. *Methods Mol Biol* 1321, 73-90. doi: 10.1007/978-1-4939-2760-9\_6.
- Hardy, D., Bill, R.M., Jawhari, A., and Rothnie, A.J. (2019). Functional Expression of Multidrug Resistance Protein 4 MRP4/ABCC4. *SLAS Discov* 24(10), 1000-1008. doi: 10.1177/2472555219867070.
- Hattab, G., Warschawski, D.E., Moncoq, K., and Miroux, B. (2015). Escherichia coli as host for membrane protein structure determination: a global analysis. *Sci Rep* 5, 12097. doi: 10.1038/srep12097.
- Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schioth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16(12), 829-842. doi: 10.1038/nrd.2017.178.
- Heyde, S.A.H., and Norholm, M.H.H. (2021). Tailoring the evolution of BL21(DE3) uncovers a key role for RNA stability in gene expression toxicity. *Commun Biol* 4(1), 963. doi: 10.1038/s42003-021-02493-4.

- Hiroaki, Y., Tani, K., Kamegawa, A., Gyobu, N., Nishikawa, K., Suzuki, H., et al. (2006). Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol* 355(4), 628-639. doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.081.
- Hochbaum, D.R., Zhao, Y., Farhi, S.L., Klapoetke, N., Werley, C.A., Kapoor, V., et al. (2014). All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat Methods* 11(8), 825-833. doi: 10.1038/nmeth.3000.
- Horne, J.E., Brockwell, D.J., and Radford, S.E. (2020). Role of the lipid bilayer in outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 295(30), 10340-10367. doi: 10.1074/jbc.REV120.011473.
- Hui, M.P., Foley, P.L., and Belasco, J.G. (2014). Messenger RNA degradation in bacterial cells. *Annu Rev Genet* 48, 537-559. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092340.
- Iost, I., Guillerez, J., and Dreyfus, M. (1992). Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *J Bacteriol* 174(2), 619-622. doi: 10.1128/jb.174.2.619-622.1992.
- Jain, C., and Belasco, J.G. (1995). Autoregulation of RNase E synthesis in Escherichia coli. *Nucleic Acids Symp Ser* (33), 85-88.
- Jarvis, D.L. (2009). Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol* 463, 191-222. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63014-7.
- Jelokhani-Niaraki, M. (2022). Membrane Proteins: Structure, Function and Motion. *Int J Mol Sci* 24(1). doi: 10.3390/ijms24010468.
- Jeong, H., Kim, H.J., and Lee, S.J. (2015). Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. *Genome Announc* 3(2). doi: 10.1128/genomeA.00134-15.
- Jidenko, M., Nielsen, R.C., Sorensen, T.L., Moller, J.V., le Maire, M., Nissen, P., et al. (2005). Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33), 11687-11691. doi: 10.1073/pnas.0503986102.
- Johnston, J.M., Arcus, V.L., Morton, C.J., Parker, M.W., and Baker, E.N. (2003). Crystal structure of a putative methyltransferase from Mycobacterium tuberculosis: misannotation of a genome clarified by protein structural analysis. *J Bacteriol* 185(14), 4057-4065. doi: 10.1128/JB.185.14.4057-4065.2003.
- Jones, B.D., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Warren, J.W., and Mobley, H.L. (1990). Construction of a urease-negative mutant of Proteus mirabilis: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 58(4), 1120-1123. doi: 10.1128/iai.58.4.1120-1123.1990.

- Jung, H.J., Jang, H.J., and Kwon, T.H. (2021). Aquaporins implicated in the cell proliferation and the signaling pathways of cell stemness. *Biochimie* 188, 52-60. doi: 10.1016/j.biochi.2021.04.006.
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2008). Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol Life Sci* 65(11), 1729-1755. doi: 10.1007/s00018-008-8067-5.
- Kamo, N., Hashiba, T., Kikukawa, T., Arais, T., Ihara, K., and Nara, T. (2006). A light-driven proton pump from *Haloterrigena turkmenica*: functional expression in *Escherichia coli* membrane and coupling with a H<sup>+</sup> co-transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 341(2), 285-290. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.181.
- Kampinga, H.H., Andreasson, C., Barducci, A., Cheetham, M.E., Cyr, D., Emanuelsson, C., et al. (2019). Function, evolution, and structure of J-domain proteins. *Cell Stress Chaperones* 24(1), 7-15. doi: 10.1007/s12192-018-0948-4.
- Kawate, T., and Gouaux, E. (2006). Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure* 14(4), 673-681. doi: 10.1016/j.str.2006.01.013.
- Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460(7255), 592-598. doi: 10.1038/nature08198.
- Kelley, W.L., and Georgopoulos, C. (1997). Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 25(5), 913-931. doi: 10.1111/j.1365-2958.1997.mmi527.x.
- Kesidis, A., Depping, P., Lode, A., Vaitopoulou, A., Bill, R.M., Goddard, A.D., et al. (2020). Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts. *Methods* 180, 3-18. doi: 10.1016/j.ymeth.2020.06.006.
- Khemici, V., Poljak, L., Luisi, B.F., and Carpousis, A.J. (2008). The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Molecular Microbiology* 70(4), 799-813. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06454.x.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., et al. (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* 12(5), 291-299. doi: 10.1093/dnares/dsi012.

- Kityk, R., Kopp, J., and Mayer, M.P. (2018). Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones. *Mol Cell* 69(2), 227-237 e224. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.003.
- Kodedova, M., and Sychrova, H. (2015). Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 10(9), e0139306. doi: 10.1371/journal.pone.0139306.
- Kudva, R., Denks, K., Kuhn, P., Vogt, A., Muller, M., and Koch, H.G. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res Microbiol* 164(6), 505-534. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.016.
- Kuhn, A., Koch, H.G., and Dalbey, R.E. (2017). Targeting and Insertion of Membrane Proteins. *EcoSal Plus* 7(2). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2016.
- Kwon, S.K., Kim, S.K., Lee, D.H., and Kim, J.F. (2015). Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Sci Rep* 5, 16076. doi: 10.1038/srep16076.
- Lakomek, N.A., Draycheva, A., Bornemann, T., and Wintermeyer, W. (2016). Electrostatics and Intrinsic Disorder Drive Translocon Binding of the SRP Receptor FtsY. *Angew Chem Int Ed Engl* 55(33), 9544-9547. doi: 10.1002/anie.201602905.
- Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1), 101-123. doi: 10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005.
- Lee, K., Bernstein, J.A., and Cohen, S.N. (2002). RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 43(6), 1445-1456. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02848.x.
- Lee, K., Zhan, X., Gao, J., Qiu, J., Feng, Y., Meganathan, R., et al. (2003). RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* 114(5), 623-634.
- Lehnik-Habrink, M., Newman, J., Rothe, F.M., Solovyova, A.S., Rodrigues, C., Herzberg, C., et al. (2011). RNase Y in *Bacillus subtilis*: a Natively disordered protein that is the functional equivalent of RNase E from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193(19), 5431-5441. doi: 10.1128/JB.05500-11.

- Lehnik-Habrink, M., Pfortner, H., Rempeters, L., Pietack, N., Herzberg, C., and Stulke, J. (2010). The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol* 77(4), 958-971. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07264.x.
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M., and Carpousis, A.J. (2002). Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol* 45(5), 1231-1243. doi: DOI 10.1046/j.1365-2958.2002.03104.x.
- Li, Y., and Altman, S. (2003). A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23), 13213-13218. doi: 10.1073/pnas.2235589100.
- Li, Z., and Deutscher, M.P. (2002). RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* 8(1), 97-109. doi: 10.1017/s1355838202014929.
- Link, A.J., Skretas, G., Strauch, E.M., Chari, N.S., and Georgiou, G. (2008). Efficient production of membrane-integrated and detergent-soluble G protein-coupled receptors in *Escherichia coli*. *Protein Sci* 17(10), 1857-1863. doi: 10.1110/ps.035980.108.
- Liu, M.Q., Chen, Z., and Chen, L.X. (2016). Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin* 37(4), 425-443. doi: 10.1038/aps.2015.145.
- Liu, Q., Liang, C., and Zhou, L. (2020). Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. *Protein Sci* 29(2), 378-390. doi: 10.1002/pro.3725.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309(5736), 897-903. doi: 10.1126/science.1116269.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A., and Dreyfus, M. (1999). The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol* 33(1), 188-199. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01465.x.
- Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., and de Gier, J.W. (2005). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 59, 329-355. doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121246.
- Mackie, G.A. (2013). RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat Rev Microbiol* 11(1), 45-57. doi: 10.1038/nrmicro2930.

- Madhavan, V., Bhatt, F., and Jeffery, C.J. (2010). Recombinant expression screening of *P. aeruginosa* bacterial inner membrane proteins. *BMC Biotechnol* 10, 83. doi: 10.1186/1472-6750-10-83.
- Massey-Gendel, E., Zhao, A., Boulting, G., Kim, H.Y., Balamotis, M.A., Seligman, L.M., et al. (2009). Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in *E. coli*. *Protein Sci* 18(2), 372-383. doi: 10.1002/pro.39.
- Mathieu, K., Javed, W., Vallet, S., Lesterlin, C., Candusso, M.P., Ding, F., et al. (2019). Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from *E. coli* is highly dependent upon the strain. *Sci Rep* 9(1), 2654. doi: 10.1038/s41598-019-39382-0.
- Mathy, N., Benard, L., Pellegrini, O., Daou, R., Wen, T., and Condon, C. (2007). 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* 129(4), 681-692. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.051.
- McDowell, M.A., Heimes, M., and Sinning, I. (2021). Structural and molecular mechanisms for membrane protein biogenesis by the Oxal superfamily. *Nat Struct Mol Biol* 28(3), 234-239. doi: 10.1038/s41594-021-00567-9.
- Mercier, E., Wang, X., Bogeholz, L.A.K., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2022). Cotranslational Biogenesis of Membrane Proteins in Bacteria. *Front Mol Biosci* 9, 871121. doi: 10.3389/fmolb.2022.871121.
- Meuskens, I., Michalik, M., Chauhan, N., Linke, D., and Leo, J.C. (2017). A New Strain Collection for Improved Expression of Outer Membrane Proteins. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 464. doi: 10.3389/fcimb.2017.00464.
- Michou, M., Delivoria, D.C., and Skretas, G. (2020a). High-level Production of Recombinant Membrane Proteins Using the Engineered *Escherichia coli* Strains SuptoxD and SuptoxR. *Bio Protoc* 10(15), e3710. doi: 10.21769/BioProtoc.3710.
- Michou, M., Kapsalis, C., Pliotas, C., and Skretas, G. (2019). Optimization of Recombinant Membrane Protein Production in the Engineered *Escherichia coli* Strains SuptoxD and SuptoxR. *ACS Synth Biol* 8(7), 1631-1641. doi: 10.1021/acssynbio.9b00120.
- Michou, M., Stergios, A., and Skretas, G. (2020b). SuptoxD2.0: A second-generation engineered *Escherichia coli* strain achieving further enhanced levels of recombinant membrane protein production. *Biotechnol Bioeng* 117(8), 2434-2445. doi: 10.1002/bit.27378.
- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260(3), 289-298. doi: 10.1006/jmbi.1996.0399.

- Misawa, N., Osaki, T., and Takeuchi, S. (2018). Membrane protein-based biosensors. *J R Soc Interface* 15(141). doi: 10.1098/rsif.2017.0952.
- Misra, T.K., and Apirion, D. (1979). RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254(21), 11154-11159.
- Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2000). Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22), 11966-11971. doi: 10.1073/pnas.220295997.
- Monzingo, A.F., Gao, J., Qiu, J., Georgiou, G., and Robertus, J.D. (2003). The X-ray structure of *Escherichia coli* RraA (MenG), A protein inhibitor of RNA processing. *J Mol Biol* 332(5), 1015-1024. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00970-7.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T., and Aiba, H. (2004). Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54(4), 1063-1075. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04329.x.
- Murashko, O.N., and Lin-Chao, S. (2017). *Escherichia coli* responds to environmental changes using enolase degradosomes and stabilized DicF sRNA to alter cellular morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(38), E8025-E8034. doi: 10.1073/pnas.1703731114.
- Murphy, K.C. (1998). Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180(8), 2063-2071. doi: 10.1128/JB.180.8.2063-2071.1998.
- Nannenga, B.L., and Baneyx, F. (2011a). Enhanced expression of membrane proteins in *E. coli* with a P(BAD) promoter mutant: synergies with chaperone pathway engineering strategies. *Microb Cell Fact* 10, 105. doi: 10.1186/1475-2859-10-105.
- Nannenga, B.L., and Baneyx, F. (2011b). Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Science* 20(8), 1411-1420. doi: 10.1002/pro.669.
- Natale, P., Bruser, T., and Driessen, A.J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778(9), 1735-1756. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
- Niyogi, S.K., and Datta, A.K. (1975). A novel oligoribonuclease of *Escherichia coli*. I. Isolation and properties. *J Biol Chem* 250(18), 7307-7312.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5(12), 993-996. doi: 10.1038/nrd2199.

- Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A., et al. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285(1), 111-117. doi: 10.1006/bbrc.2001.5130.
- Palczewski, K. (2006). G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 75, 743-767. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142743.
- Park, E., Menetret, J.F., Gumbart, J.C., Ludtke, S.J., Li, W., Whynot, A., et al. (2014). Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature* 506(7486), 102-106. doi: 10.1038/nature12720.
- Pedelacq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 24(1), 79-88. doi: 10.1038/nbt1172.
- Pullinger, G.D., Dziva, F., Charleston, B., Wallis, T.S., and Stevens, M.P. (2008). Identification of *Salmonella enterica* serovar Dublin-specific sequences by subtractive hybridization and analysis of their role in intestinal colonization and systemic translocation in cattle. *Infect Immun* 76(11), 5310-5321. doi: 10.1128/IAI.00960-08.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* 381(6578), 169-172. doi: 10.1038/381169a0.
- Qi, X., Gao, J., Li, Z., Zhang, G., Li, J., Fu, Y., et al. (2022). CDCP1: A promising diagnostic biomarker and therapeutic target for human cancer. *Life Sci* 301, 120600. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120600.
- Ratelade, J., Miot, M.C., Johnson, E., Betton, J.M., Mazodier, P., and Benaroudj, N. (2009). Production of recombinant proteins in the lon-deficient BL21(DE3) strain of *Escherichia coli* in the absence of the DnaK chaperone. *Appl Environ Microbiol* 75(11), 3803-3807. doi: 10.1128/AEM.00255-09.
- Rees, D.C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(3), 218-227. doi: 10.1038/nrm2646.
- Rehse, P.H., Kuroishi, C., and Tahirov, T.H. (2004). Structure of the RNA-processing inhibitor RraA from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 11), 1997-2002. doi: 10.1107/S0907444904021146.
- Robinson, P.J., Findlay, J.E., and Woolhead, C.A. (2012). Compaction of a prokaryotic signal-anchor transmembrane domain begins within the ribosome tunnel and is stabilized by SRP during targeting. *J Mol Biol* 423(4), 600-612. doi: 10.1016/j.jmb.2012.07.023.

- Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., et al. (2006). Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 125(5), 1003-1013. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.042.
- Saier, M.H., Reddy, V.S., Moreno-Hagelsieb, G., Hendargo, K.J., Zhang, Y., Iddamsetty, V., et al. (2021). The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 update. *Nucleic Acids Res* 49(D1), D461-D467. doi: 10.1093/nar/gkaa1004.
- Salazar, G.T.a., Huang, Z., Zhang, N., Zhang, X.-G., and An, Z. (2021). Antibody therapies targeting complex membrane proteins. *Engineering* 7(11), 1541-1551. doi: doi.org/10.1016/j.eng.2020.11.013.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16(1), 19-34. doi: 10.1038/nrd.2016.230.
- Sarkar, C.A., Dodevski, I., Kenig, M., Dudli, S., Mohr, A., Hermans, E., et al. (2008). Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39), 14808-14813. doi: 10.1073/pnas.0803103105.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., and Milon, A. (2003). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol Life Sci* 60(8), 1529-1546. doi: 10.1007/s00018-003-3168-7.
- Schlegel, S., Genevaux, P., and de Gier, J.W. (2015). De-convoluting the Genetic Adaptations of E. coli C41(DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields. *Cell Rep* 10(10), 1758-1766. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.029.
- Schulz, G.E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1565(2), 308-317. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00577-1.
- Schulz, G.E. (2003). Transmembrane beta-barrel proteins. *Adv Protein Chem* 63, 47-70. doi: 10.1016/s0065-3233(03)63003-2.
- Schwartz, R., and King, J. (2006). Frequencies of hydrophobic and hydrophilic runs and alternations in proteins of known structure. *Protein Sci* 15(1), 102-112. doi: 10.1110/ps.051741806.
- Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J.W., von Heijne, G., van der Does, C., et al. (2000). YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J* 19(4), 542-549. doi: 10.1093/emboj/19.4.542.

- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., et al. (2004). Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J* 23(2), 294-301. doi: 10.1038/sj.emboj.7600063.
- Sethuraman, N., and Stadheim, T.A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 17(4), 341-346. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.010.
- Shen, J., Zhang, D., Fu, Y., Chen, A., Yang, X., and Zhang, H. (2022). Cryo-EM structures of human bradykinin receptor-G(q) proteins complexes. *Nat Commun* 13(1), 714. doi: 10.1038/s41467-022-28399-1.
- Shen, J.K., and Zhang, H.T. (2023). Function and structure of bradykinin receptor 2 for drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 44(3), 489-498. doi: 10.1038/s41401-022-00982-8.
- Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli. *Gene* 151(1-2), 131-135. doi: 10.1016/0378-1119(94)90643-2.
- Skretas, G., and Georgiou, G. (2009). Genetic analysis of G protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: inhibitory role of DnaJ on the membrane integration of the human central cannabinoid receptor. *Biotechnol Bioeng* 102(2), 357-367. doi: 10.1002/bit.22097.
- Skretas, G., and Georgiou, G. (2010). Simple genetic selection protocol for isolation of overexpressed genes that enhance accumulation of membrane-integrated human G protein-coupled receptors in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 76(17), 5852-5859. doi: 10.1128/AEM.00963-10.
- Skretas, G., and Wood, D.W. (2005). Regulation of protein activity with small-molecule-controlled inteins. *Protein Sci* 14(2), 523-532. doi: 10.1110/ps.04996905.
- Smets, D., Loos, M.S., Karamanou, S., and Economou, A. (2019). Protein Transport Across the Bacterial Plasma Membrane by the Sec Pathway. *Protein J* 38(3), 262-273. doi: 10.1007/s10930-019-09841-8.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462(7274), 745-756. doi: 10.1038/nature08624.
- Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H., and Spudich, E.N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 365-392. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.365.

- Srinivasan, V., Pierik, A.J., and Lill, R. (2014). Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* 343(6175), 1137-1140. doi: 10.1126/science.1246729.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189(1), 113-130. doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- Sundberg, E., Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C., and Coupland, G. (1997). ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* 9(5), 717-730. doi: 10.1105/tpc.9.5.717.
- Tang, J., Luo, M., Niu, S., Zhou, H., Cai, X., Zhang, W., et al. (2010). The crystal structure of hexamer RraA from *Pseudomonas aeruginosa* reveals six conserved protein-protein interaction sites. *Protein J* 29(8), 583-590. doi: 10.1007/s10930-010-9293-x.
- Taraseviciene, L., Miczak, A., and Apirion, D. (1991). The gene specifying RNase E (rne) and a gene affecting mRNA stability (ams) are the same gene. *Mol Microbiol* 5(4), 851-855. doi: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00758.x.
- Taylor, P.D., Toseland, C.P., Attwood, T.K., and Flower, D.R. (2006). Alpha helical trans-membrane proteins: Enhanced prediction using a Bayesian approach. *Bioinformatics* 1(6), 234-236.
- Tomatis, P.E., Schutz, M., Umudumov, E., and Pluckthun, A. (2019). Mutations in sigma 70 transcription factor improves expression of functional eukaryotic membrane proteins in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 9(1), 2483. doi: 10.1038/s41598-019-39492-9.
- Tucker, J., and Grisshammer, R. (1996). Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* 317 ( Pt 3)(Pt 3), 891-899. doi: 10.1042/bj3170891.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., et al. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427(6969), 36-44. doi: 10.1038/nature02218.
- Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., et al. (1998). Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev* 12(17), 2770-2781. doi: 10.1101/gad.12.17.2770.
- Vasilopoulou, E., Giannakopoulou, A., Kapsalis, C., Michou, M., Michoglou-Sergiou, A., Kolisis, F.N., et al. (2022). Second-Generation *Escherichia coli* SuptoxR Strains for High-Level Recombinant Membrane Protein Production. *ACS Synth Biol* 11(8), 2599-2609. doi: 10.1021/acssynbio.1c00598.

- von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225(2), 487-494. doi: 10.1016/0022-2836(92)90934-c.
- von Heijne, G. (2007). The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J Intern Med* 261(6), 543-557. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01792.x.
- Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A.J., Klussmeier, A., Wagner, C.S., Nord, O., et al. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli. *Mol Cell Proteomics* 6(9), 1527-1550. doi: 10.1074/mcp.M600431-MCP200.
- Wagner, S., Bader, M.L., Drew, D., and de Gier, J.W. (2006). Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol* 24(8), 364-371. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.06.008.
- Wagner, S., Klepsch, M.M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., et al. (2008). Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38), 14371-14376. doi: 10.1073/pnas.0804090105.
- Wallin, E., and von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7(4), 1029-1038. doi: 10.1002/pro.5560070420.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays Biochem* 59, 43-69. doi: 10.1042/bse0590043.
- Weiss, H.M., and Grisshammer, R. (2002). Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli. *Eur J Biochem* 269(1), 82-92. doi: 10.1046/j.0014-2956.2002.02618.x.
- White, S.H., and Wimley, W.C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 319-365. doi: 10.1146/annurev.biophys.28.1.319.
- Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., et al. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduct Target Ther* 6(1), 7. doi: 10.1038/s41392-020-00435-w.
- Yeom, J.H., Go, H., Shin, E., Kim, H.L., Han, S.H., Moore, C.J., et al. (2008). Inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E-related enzymes imply conserved functions in the regulated enzymatic cleavage of RNA. *FEMS Microbiol Lett* 285(1), 10-15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01205.x.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., and Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 127(3), 335-347. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012.

- Yousefian, N., Ornik-Cha, A., Poussard, S., Decossas, M., Berbon, M., Daury, L., et al. (2021). Structural characterization of the EmrAB-TolC efflux complex from *E. coli*. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1863(1), 183488. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183488.
- Zhang, X., Rashid, R., Wang, K., and Shan, S.O. (2010). Sequential checkpoints govern substrate selection during cotranslational protein targeting. *Science* 328(5979), 757-760. doi: 10.1126/science.1186743.
- Zhao, M., Zhou, L., Kawarasaki, Y., and Georgiou, G. (2006). Regulation of RraA, a protein inhibitor of RNase E-mediated RNA decay. *J Bacteriol* 188(9), 3257-3263. doi: 10.1128/JB.188.9.3257-3263.2006.
- Zuo, Y., and Deutscher, M.P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* 29(5), 1017-1026. doi: 10.1093/nar/29.5.1017.