

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mitja MAHNIČ

**UPORABA GENOMIKE IN PROTEOMIKE PRI  
ANALIZI DEJAVNIKOV NASTANKA NEKLASIČNIH  
INKLUZIJSKIH TELES V BAKTERIJI *Escherichia coli***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mitja MAHNIČ

**UPORABA GENOMIKE IN PROTEOMIKE PRI ANALIZI  
DEJAVNIKOV NASTANKA NEKLASIČNIH INKLUZIJSKIH TELES V  
BAKTERIJI *Escherichia coli***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENOMICS AND PROTEOMICS TOOLS FOR IDENTIFICATION OF  
FACTORS THAT INFLUENCE THE FORMATION OF  
"UNCLASSICAL" INCLUSION BODIES IN *Escherichia coli***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Z doktorsko disertacijo zaključujem podiplomski doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti na znanstvenem področju Genetika na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, na Oddelku za biosintezo in biotransformacijo Kemijskega inštituta ter na Oddelku za nove generacije proteinov Biofarmacevtike podjetja Lek, d. d. Nekatere analize (optično branje mikromrež) so bile opravljene na Centru za funkcionalno genomiko in biočipe Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorico doktorske disertacije imenoval prof. dr. Kristino Gruden.

Mentorica: prof. dr. Kristina Gruden

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Marko DOLINAR

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo

Članica: prof. dr. Kristina GRUDEN

Nacionalni Inštitut za Biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 9. 9. 2013

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mitja Mahnič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 575.111:577.21(043.3)=163.6
KG	produkacija rekombinantnih proteinov/neklašična inkluzijska telesa/ <i>E. coli</i> /mikromreže/proteaza YeaZ/šaperon GroEL/šaperoni za gibljivost bakterije <i>E. coli</i>
AV	MAHNIČ, Mitja, univ. dipl. kem.
SA	GRUDEN, Kristina (mentorica)
KZ	1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti na znanstvenem področju Genetika
LI	2013
IN	UPORABA GENOMIKE IN PROTEOMIKE PRI ANALIZI DEJAVNIKOV NASTANKA NEKLAŠIČNIH INKLUIZIJSKIH TELES V BAKTERIJI <i>Escherichia coli</i>
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 126 str., 35 pregl., 27 sl., 140 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen doktorskega dela je bil razložiti procese, ki pri različnih temperaturah gojenja (25 °C, 37 °C in 42 °C) vplivajo na tvorbo neklašičnih inkluzijskih teles, predvsem v povezavi z aktivnostmi proteaz in šaperonov bakterije <i>E. coli</i> . Z metodama mikromrež in qPCR smo preverili različno izražanje genov pri treh različnih temperaturah (tj. 25 °C, 37 °C in 42 °C) v kontrolnem in produkcijskem sevu bakterije <i>E. coli</i> . Spremljali smo razlike v izražanju genov med različnimi temperaturami pri enem sevu, pa tudi med obema sevoma pri isti temperaturi. Preučevane vzorce smo hibridizirali na mikromrežah in jih nato optično brali. Temu je sledila analiza podatkov s kvantilno normalizacijo, nato pa statistično vrednotenje s t-preizkusom in s preizkusom ANOVA. Prav tako smo dobljene vrednosti analizirali z bioinformacijsko iniciativo GO (Gene Ontology) in z analizo po metodi GSEA. Iz nabora vseh genov bakterije <i>E. coli</i> jih je bilo povprečno pri 25 °C statistično značilno različno izraženih 13 %, če smo primerjali kontrolne seve, gojene pri 37 °C, in 10 % pri 42 °C ter 3 %, če smo primerjali produkcijske seve, gojene pri 42 °C in 37 °C. Za funkcionalno analizo statistično značilno različno izraženih genov smo uporabili orodje EcoCyc. V povprečju smo na diagram pregleda celičnih funkcij bakterije <i>E. coli</i> preslikali približno 44 % vseh statistično značilno različno izraženih genov. Identificirani statistično značilno različno izraženi geni so vpleteni v energetski metabolizem ter v metabolizem aminokislin in nukletidov ter kofaktorjev in sekundarnih metabolitov. Izmed do zdaj znanih genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine, jih je bilo kar 70 % statistično značilno različno izraženih. Z metodo kvantitativnega PCR smo preverili izražanje 6 izbranih genov. Statistično značilno razliko rezultatov, dobljenih z mikromrežami in s qPCR, smo primerjalno potrdili. Z metodo določevanja proteinov po prenosu Westernu (WB) smo za protein GroEL potrdili rezultate hibridizacij mikromrež in qPCR pri vseh temperaturah in obeh sevih. Med podrobnejšo analizo šaperonov in proteaz smo ugotovili, da sta bili izražanji genov, ki nosita zapis za šaperona GroEL in DnaK, pozitivno regulirani pri zvišani temperaturi, izražanje genov, ki nosijo zapis za faktorje sigma, je ostalo nespremenjeno, geni, ki nosijo zapise za šaperone, odgovorne za gibljivost bakterije <i>E. coli</i> , pa so kazali povečano aktivnost izražanja pri 25 °C. Pri višjih temperaturah so bili geni, ki nosijo zapise za proteaze citoplazemske membrane, večinoma negativno regulirani, geni, ki nosijo zapise za proteaze periplazme, pa pozitivno. Posredno smo tako pri tvorbi neklašičnih inkluzijskih teles pri 25 °C pokazali pomembno vlogo šaperona GroEL ter proteaz YeaZ in YaeL.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd  
DC UDK 575.111:577.21(043.3)=163.6  
CX recombinant protein production/ non-classical inclusion bodies/*E. coli*/expression microarrays/ YeaZ protease/GroEL chaperone/Flagellum specific chaperones  
AU MAHNIČ, Mitja  
AA GRUDEN, Kristina (supervisor)  
PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study in Biotechnology and Genetics  
PY 2013  
TI GENOMICS AND PROTEOMICS TOOLS FOR IDENTIFICATION OF FACTORS THAT INFLUENCE THE FORMATION OF "NON-CLASSICAL" INCLUSION BODIES IN *Escherichia coli*  
DT Doctoral Dissertation  
NO XV, 126 p., 35 tab., 27 fig., 140 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The goal of research was to investigate mechanisms determining characteristics of non-classical inclusion bodies production using gene expression profiling in connection with activity of a certain group of proteases and chaperones. Differential gene expression at three different temperatures (i.e. 25 °C , 37 °C and 42 °C) for the production and the control strain was studied using microarray analysis and qPCR. Studied samples were first hybridized to oligonucleotide microarrays. After scanning and quantile normalization the data was analyzed using t-test. Additionally, two-way analysis of variance was performed as well as analysis of gene expression changes was performed using GSEA. Approximately 13 % differentially expressed genes were identified when comparing control strain cultures grown at 37 °C to the ones grown at 25 °C and 10 % if grown at 42 °C. On the other hand, 3 % of genes were differentially expressed if comparing production strain and control strain at 37 °C and 42 °C, respectively. On average 44 % of differentially expressed genes were linked onto *E. coli* pathways diagram. Prominent changes in energy metabolism, in metabolism of amino acids and nucleotides, as well as in biosynthesis of cofactors and secondary metabolites were observed. When considering genes that code for chaperones, proteases and other stress-related genes 20 % of them showed statistically significant changes in expression. Real-time PCR was used to monitor the expression of seven selected genes. Results obtained by real-time PCR were in agreement with microarray results. Furthermore, the results of Western blot analysis for GroEL confirmed results of microarray hybridizations and qPCR for both, control and production strain. The differential expression levels of chaperones GroEL and DnaK were upregulated at elevated temperatures, regulation of sigma factors remained practically unchanged whereas some flagellum-specific chaperones showed higher gene activity at 25 °C. Cytoplasmic membrane proteases were in majority down-regulated whereas periplasm proteases were up-regulated at elevated temperatures. Alltogether, results suggested that YeaZ, YaeL and GroEL might have an important role in folding of recombinant protein.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIII
Slovarček	XV
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	3
1.2 CILJI DOKTORSKE NALOGE	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA	4
2.1.1 Vektorji	4
2.2 BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i>	6
2.2.1 Sev B bakterije <i>E. coli</i>	7
2.2.2 Promotorji	8
2.3 PROKARIOTSKA RNA-POLIMERAZA	9
2.4 TEMPERATURNI STRES	12
2.5 ŠAPERONI IN PROTEAZE	14
2.5.1 Šaperoni	15
2.5.2 Proteaze	20
2.6 INTERAKCIJE PROTEINOV V ODZIVU NA TEMPERATURNI STRES	23
2.7 INKLUIJSKA TELESA	25
2.8 ČLOVEŠKI DEJAVNIK SPODBUJANJA NASTANKA KOLONIJ GRANULOCITOV (hG-CSF)	26
2.8.1 Hemopoeza	26
2.8.2 Hemopoetski faktorji	26
2.8.3 Človeški dejavnik spodbujanja nastanka kolonij granulocitov (hG-CSF)	27
2.9 MIKROMREŽE	29
2.9.1 PRIPRAVA IN HIBRIDIZACIJA MIKROMREŽ	29
2.9.2 ANALIZA PODATKOV MIKROMREŽ	30
2.10 TRANSKRIPTOMSKE ANALIZE BAKTERIJE <i>E. coli</i>	31

<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>32</b>
3.1	SEVI IN PLAZMIDI	32
3.2	GOJIŠČA	32
3.3	RAZTOPINE IN PUFRI	34
3.4	PRIPRAVA BAKTERIJSKIH SEVOV	34
3.4.1	Priprava inokuluma za kontrolni in produkcijski sev	34
3.4.2	Gojenje bakterijskih kultur	35
3.4.3	Izdelava rastnih krivulj bakterijskih sevov	35
3.5	IZOLACIJA celotne RNA, RAZGRADNJA Z DNazo ter ČIŠČENJE in KONCENTRIRANJE RNA	35
3.5.1	Postopek izolacije totRNA	36
3.5.2	Določanje kakovosti in koncentracije izolirane RNA z agarozno gelsko elektroforezo	37
3.5.3	Razgradnja z DNazo	38
3.5.4	Čiščenje in koncentriranje RNA	38
3.6	SINTEZA cDNA	39
3.6.1	Sinteza prve verige cDNA	39
3.6.2	Zaustavitev sinteze cDNA	40
3.6.3	Čiščenje označene cDNA	40
3.6.4	Določanje koncentracije cDNA in vgrajenih barvil	41
3.7	HIBRIDIZACIJA MIKROMREŽ	41
3.7.1	Priprava mikromrež	41
3.7.2	Hibridizacija mikromrež	42
3.8	ANALIZA SLIKE IN OBDELAVA PODATKOV MIKROMREŽ	45
3.9	ANALIZA IN VIZUALIZACIJA PODATKOV S PODATKOVNO ZBIRKO ECOCYC	46
3.10	PCR V REALNEM ČASU	47
3.10.1	Obratno prepisovanje	47
3.10.2	Načrtovanje začetnih nukleotidov	48
3.10.3	Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)	49
3.11	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (NaDS-PAGE)	50
3.12	ANALIZA PROTEINOV – PRENOS WESTERN	51
3.13	SEMIVANTITATIVNO DENZITOMETRIČNO DOLOČANJE SPREMENJIVI RAVNI IZLOČANJA PROTEINA GroEL	52
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>53</b>
4.1	RAST KONTROLNIH IN PRODUKCIJSKIH SEVOV	53
4.2	IZOLACIJA CELOTNE RNA (totRNA)	55

<b>4.3</b>	<b>PRIMERJAVA GENOMOV SEVOV BL21 IN K-12 BAKTERIJE <i>E. coli</i></b>	<b>57</b>
<b>4.4.</b>	<b>REZULTATI ANALIZ Z DNA-MIKROMREŽAMI</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>KVANTILNA NORMALIZACIJA REZULTATOV HIBRIDIZACIJ MIKROMREŽ</b>	<b>59</b>
<b>4.6</b>	<b>PREGLED RAZLIK V IZRAŽANJU POSAMEZNIH GENOV</b>	<b>61</b>
<b>4.6.1</b>	Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu energetskih poti, aminokislin nukleotidov ter v biosintezi kofaktorjev in sekundarnih metabolitov	67
<b>4.6.2</b>	Temperaturno odvisne spremembe v ravneh izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s temperaturnim stresom povezane proteine	79
<b>4.7</b>	<b>POTRDITEV REZULTATOV MIKROMREŽNIH ANALIZ S PCR V REALNEM ČASU</b>	<b>82</b>
<b>4.8</b>	<b>SPREMENJAVA RAVNI IZLOČANJA PROTEINA GroEL</b>	<b>84</b>
<b>4.8.1</b>	<b>ANALIZA PROTEINOV – PRENOS WESTERN</b>	<b>84</b>
<b>4.8.2</b>	DENZITOMETRIČNA ANALIZA GELOV IN MEMBRAN S PROGRAMOM ImageJ	87
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>90</b>
<b>5.1.1</b>	Rast kontrolnih in produkcijskih sevov	90
<b>5.1.2</b>	Primerjava genomov sevov BL21 in K-12 bakterije <i>E. coli</i>	90
<b>5.1.3</b>	Pregled razlik v izražanju posameznih genov, prisotnih v metabolnih poteh bakterije <i>E. coli</i>	90
<b>5.1.4</b>	Pregled razlik v izražanju posameznih genov, ki nosijo zapis za molekulske šaperone in proteaze	92
<b>5.1.4.1</b>	Statistično značilno različno izražanje genov, ki nosijo zapis za šaperone	93
<b>5.1.4.2</b>	Statistično značilno različno izražanje genov, ki nosijo zapis za proteaze	102
<b>5.1.4.3</b>	Sekundarna struktura mRNA faktorja sigma32 posredno vpliva na raven akumulacije rekombinantnega proteina hG-CSF	106
<b>5.2</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>109</b>
<b>6.1</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>109</b>
<b>6.2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>114</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b>	Značilnosti in uporabnost različnih vektorskih sistemov	5
<b>Preglednica 2:</b>	Nekaj sevov bakterije <i>E. coli</i> in njihove značilnosti	6
<b>Preglednica 3:</b>	Faktorji sigma družine $\sigma^{70}$ bakterije <i>E. coli</i> (Lewin, 1997)	12
<b>Preglednica 4:</b>	Nekateri znani geni hsr bakterije <i>E. coli</i> , ki so pod kontrolo faktorja sigma 32 in imajo znano funkcijo (Schumann, 1996; ter Zhao in sod., 2005)	14
<b>Preglednica 5:</b>	Prikaz nekaterih najpomembnejših šaperonov in njihove lokacije v bakteriji <i>E. coli</i> (Hartl, 1996; Hartl in sod., 2011; ter Guisbert in sod., 2004)	16
<b>Preglednica 6:</b>	Nekaj proteaz bakterije <i>E. coli</i> glede na lokacijo v celici (Gottesman, 1996; ter Molecular Cell Biology, 2010)	21
<b>Preglednica 7:</b>	Priprava osnovne reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo na eno reakcijo oziroma vzorec	40
<b>Preglednica 8:</b>	Prikaz oznak vzorcev za hibridizacije	42
<b>Preglednica 9:</b>	Priprava predhibridizacijske raztopine	43
<b>Preglednica 10:</b>	Priprava hibridizacijske raztopine	44
<b>Preglednica 11:</b>	Funkcije delovanja posameznih izbranih genov (podatkovne zbirke EcoCyc, KEGG in UniProt)	47
<b>Preglednica 12:</b>	Priprava osnovne reakcijske mešanice	48
<b>Preglednica 13:</b>	Sonde in začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času	49
<b>Preglednica 14:</b>	Priprava pufrov za elektroforezo NaDS-PAGE	50
<b>Preglednica 15:</b>	Barvanje z barvilom Simply Blue	50
<b>Preglednica 16:</b>	Priprava detekcijske raztopine ter raztopin primarnega in sekundarnega protitelesa	52
<b>Preglednica 17:</b>	Primerjava končnih vrednosti biomase: optična gostota OD <sub>600</sub> pri različnih temperaturah z insertom G-CSF in brez njega	54
<b>Preglednica 18:</b>	Oznake vzorcev in koncentracije RNA	56
<b>Preglednica 19:</b>	Razlaga oznak kvadratov kvantilne normalizacije	61
<b>Preglednica 20:</b>	Število statistično značilno različno izraženih genov	62
<b>Preglednica 21:</b>	Funkcionalna analiza statistično značilno različno izraženih genov z metodo GSEA	64
<b>Preglednica 22:</b>	Število statistično značilno različno izraženih genov glede na podatkovno zbirko EcoCyc – primerjava kontrolnega oz. produkcijskega seva pri različnih temperaturah	67
<b>Preglednica 22a:</b>	Število statistično značilno različno izraženih genov glede na podatkovno zbirko EcoCyc – primerjava kontrolnega s produkcijskim sevom pri različnih temperaturah	68

<b>Preglednica 23:</b> Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu energetskih poti rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i>	71
<b>Preglednica 24:</b> Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu energetskih poti rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i> (nadaljevanje)	72
<b>Preglednica 25:</b> Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu biosinteze aminokislin rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i>	73
<b>Preglednica 26:</b> Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu nukleotidov rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i>	74
<b>Preglednica 27:</b> Temperaturno odvisne spremembe v biosintezi kofaktorjev in sekundarnih metabolitov rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i>	75
<b>Preglednica 28:</b> Primerjava izražanja genov, ki sodelujejo v energetskih metabolnih poteh seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i> med kontrolnim in produksijskim sevom pri isti temperaturi	76
<b>Preglednica 29:</b> Primerjava izražanja genov, ki sodelujejo v metabolnih poteh biosinteze aminokislin seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i> med kontrolnim in produksijskim sevom pri isti temperaturi	77
<b>Preglednica 30:</b> Primerjava izražanja genov, ki sodelujejo v metabolnih poteh biosinteze kofaktorjev in sekundarnih metabolitov seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i> med kontrolnim in produksijskim sevom pri isti temperaturi (nadaljevanje)	78
<b>Preglednica 31:</b> Temperaturno odvisne spremembe v izražanju genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i>	80
<b>Preglednica 32:</b> Primerjava izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine rekombinantnega seva BL21 (DE3) bakterije <i>E. coli</i> pri isti temperaturi	81
<b>Preglednica 33:</b> Primerjava meritev izražanja genov z mikromrežami in kvantitativnim PCR v realnem času	83
<b>Preglednica 34:</b> Prikaz ocene sprememb v koncentraciji proteina GroEL glede na koncentracijo celotnih proteinov seva BL21 bakterije <i>E. coli</i> za produksijski sev pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C	87
<b>Preglednica 35:</b> Prikaz ocene sprememb v koncentraciji pridobljenega proteina GroEL glede na koncentracijo celotnih proteinov seva BL21 bakterije <i>E. coli</i> za kontrolni sev pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C	88

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Bakterijska celica (Cells alive, 2010)	7
<b>Slika 2:</b> Nadzor prepisovanja gena za RNA-polimerazo T7 vključenega prek profaga v <i>E. coli</i> BL21 (Novy in Morris, 2001)	9
<b>Slika 3:</b> Osrednji encim prokariontske RNA-polimeraze, kjer so barvno prikazane posamezne podenote (Finn in sod., 2000)	10
<b>Slika 4:</b> Regije podenot sigma in njihove naloge (Gruber in Gross, 2003)	11
<b>Slika 5:</b> Regulon hs (angl. <i>heat shock</i> ) bakterije <i>E. coli</i> (Arsene in sod., 2000)	13
<b>Slika 6:</b> Struktura kompleksa GroEL-GroES (Chaudhry in sod., 2003; ter zbirka proteinskih struktur PDB)	17
<b>Slika 7:</b> Prikaz kompleksa GroEL-GroES-ADP*AlF3 (Chaudhry in sod., 2003)	18
<b>Slika 8:</b> Prikaz strukture hibridne molekule DnaK (Bertelsen in sod., 2009)	19
<b>Slika 9:</b> Struktura molekule DnaJ (Huang in sod., 1999, ter zbirka proteinskih struktur PDB)	19
<b>Slika 10:</b> Struktura molekule GrpE, vezane na ATPazno domeno DnaK (Harrison in sod., 1997, ter zbirka proteinskih struktur PDB)	20
<b>Slika 11:</b> Heksamerna struktura proteaze FtsH (Bieniossek in sod., 2006)	22
<b>Slika 12:</b> Pregled proteinskih interakcij med šaperoni, proteazami in RNA-polimerazo (Arifuzzaman in sod., 2006)	24
<b>Slika 13:</b> Hemopoeza (nastanek krvnih celic) (Vozelj, 2000)	27
<b>Slika 14:</b> Prikaz strukture molekule rhG-CSF (Hill in sod., 1993)	28
<b>Slika 15:</b> Mikromreža CustomArray™ s potrebnimi sestavnimi deli (CustomArray™ 12K Microarray, 2010)	42
<b>Slika 16:</b> Rastne krivulje vzorcev kultur produkcijskega in kontrolnega seva, gojenih pri 25 °C, 37 °C in pri 42 °C	54
<b>Slika 17:</b> Primer gelske elektroforeze izolirane RNA	55
<b>Slika 18:</b> Prikaz mikromrež vzorcev produkcijskega seva, gojenega pri 25 °C in pri 37 °C	58
<b>Slika 19:</b> Povečana slika posamezne mikromreže enega od vzorcev po hibridizaciji	59
<b>Slika 20:</b> Primerjava povprečij kvantilno normaliziranih podatkov med različnimi temperaturami – matrika 6 x 6	60
<b>Slika 21:</b> Vennov diagram statistično značilno izraženih genov z analizo ANOVA	63
<b>Slika 22:</b> Pregled sprememb v izražanju genov rekombinantne bakterije <i>E. coli</i> , gojene pri 37 °C glede na 25 °C	69
<b>Slika 23:</b> Pregled sprememb v izražanju genov rekombinantne bakterije <i>E. coli</i> , gojene pri 42 °C glede na 25 °C	70

<b>Slika 24:</b> Rezultat elektroforeze NaDS – PAGE celotnih proteinov bakterije <i>E. coli</i> BL21	85
<b>Slika 25:</b> Določevanje proteina GroEL po prenosu WB	86
<b>Slika 26:</b> Prikaz integracije intenzivnosti proge na WB-membrani proteina GroEL posameznega vzorca s programom ImageJ	89
<b>Slika 27:</b> Prikaz intenzivnosti vseh prog celotnih proteinov seva BL21 bakterije <i>E. coli</i> na gelu NaDS-PAGE posameznega vzorca s programom ImageJ	89

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli*  
pri 37 °C in 25 °C v produkcijskem sevu

**Priloga B:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli*  
pri 42 °C in 25 °C v produkcijskem sevu

**Priloga C:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* pri 37 °C  
in 25 °C v kontrolnem sevu

**Priloga D:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* pri 42 °C  
in 25 °C v kontrolnem sevu

**Priloga E:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli*  
kontrolnega in produkcijskega seva pri 25 °C

**Priloga F:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli*  
kontrolnega in produkcijskega seva pri 37 °C

**Priloga G:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli*  
kontrolnega in produkcijskega seva pri 42 °C

**Priloga H:** Preglednica podatkov diferenčno izraženih genov bakterije *E. coli* kontrolnega in  
produkcijskega seva glede na iniciativo GO (Gene Ontology)

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16 S – 16 S rRNA

ANOVA – analiza variance (angl. *analysis of variance*)

amp – gen za odpornost proti ampicilinu

BAC – umetni bakterijski kromosom (angl. *Bacterial Artificial Chromosome*)

cAMP – ciklični adenozinmonofosfat

cDNA – komplementarna DNA (angl. *complementary DNA*)

Ct – prazni cikel (angl. *threshold cycle*)

Cy3 – fluorescenčno barvilo cyanine 3

Da – dalton, enota za molekulsko maso

dATP – 2'-deoksiadenozintrifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DNaza – deoksiribonukleaza

DTT – ditiotreitol (treo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)

*E. coli* – *Escherichia coli*

E – učinkovitost pomnoževanja v reakciji PCR v realnem času

EDTA – etilendiaminetetraocetna kislina

GAL – seznam podatkov o naneseni cDNA na mikromreži (angl. *Genepix Allocation List*)

GeneAmp – komplet GeneAmp® RNA PCR Kit

GO – iniciativa za določitev bioloških in funkcionalnih značilnosti posameznih genov (angl. *Gene Ontology*)

GSEA – metoda analize skupin genov, ki imajo skupno biološko funkcijo (angl. *Gene Set Enrichment Analysis*)

GYST – gojišče za gojenje bakterije *E. coli*, ki vsebuje glukozo, kvasni ekstrakt, natrijev klorid in tripton

GYSP – gojišče za gojenje bakterije *E. coli*, ki vsebuje glukozo, kvasni ekstrakt, natrijev klorid in fiton

h – humani, človeški

hG-CSF – človeški dejavnik spodbujanja nastanka kolonij granulocitov (angl. *human Granulocyte Colony Stimulating Factor*)

hGM-CSF – človeški dejavnik spodbujanja nastanka kolonij granulocitov in makrofagov

hsr (hs) – odziv na temperaturo; temperaturni stres (angl. *heat shock*)

Hsp – protein temperaturnega stresa

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid

ITs – inkluzijska telesa

LB – gojišče po Luria-Bertaniju

- LBP – modificirano gojišče po Luria-Bertaniju, kjer tripton nadomestimo s fitonom  
LMW – standard nizkih molekulskih mas za določanje velikosti proteinov s PAGE v prisotnosti NaDS (angl. *Low Molecular Weight*)  
logFC –  $\log_2$  vrednosti razmerij med posameznimi izražanji vzorčnih skupin (angl. FC, *fold change*)  
luc – luciferaza  
M – enota za molarnost, mol/l  
MAC – umetni sesalski kromosom (angl. *Mammalian Artificial Chromosome*)  
MGB – molekula, ki se veže na DNA (angl. *minor groove binder*)  
mRNA – informacijska RNA (angl. *messenger RNA*)  
NADP – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat  
NADPH – reducirana oblika nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata  
NaDS – natrijev dodecilsulfat  
NaDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti detergenta NaDS  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
nkIT – neklašična inkluzijska telesa  
nt – nukleotid  
OD<sub>600</sub> – optična gostota celic pri 600 nm (angl. *Optical Density*)  
ORF – odprtji bralni okvir (angl. *Open Reading Frame*)  
PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza  
PDB – zbirka proteinskih struktur (angl. *Protein Data Bank*)  
PCN – povprečno število kopij plazmidne DNA v celici (angl. *Plasmid Copy Number*)  
PCR – verižna reakcija s polimerazo  
qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času  
PEG – polietilenglikol  
pH – negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov  
rhG-CSF – rekombinantni človeški dejavnik spodbujanja nastanka kolonij granulocitov  
RNA – ribonukleinska kislina  
rRNA – ribosomska ribonukleinska kislina  
SD – standardni odklon  
TAE – raztopina Trisa, acetata in EDTA  
TE – raztopina Trisa in EDTA  
Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol  
Triton X-100 – polietilenglikol-mono-(p-1,1,3,3-tetrametilbutil)fenileter  
UV – ultravijolično  
WB – prenos Western (angl. *Western Blotting*)  
YAC – umetni kromosom kvasovke (angl. *Yeast Artificial Chromosome*)

## SLOVARČEK

### Tričrkovne oznake aminokislin

- Ala** alanin  
**Arg** arginin  
**Asn** asparagin  
**Asp** asparaginska kislina  
**Cys** cistein  
**Gln** glutamin  
**Glu** glutaminska kislina  
**Gly** glicin  
**His** histidin  
**Ile** izolevcin  
**Leu** levcin  
**Lys** lizin  
**Met** metionin  
**Phe** fenilalanin  
**Pro** prolin  
**Ser** serin  
**Thr** treonin  
**Trp** triptofan  
**Tyr** tirozin  
**Val** valin

### Enočrkovne oznake nukleotidov

- A** adenin  
**C** citozin  
**G** gvanin  
**T** timin  
**U** uracil

## 1 UVOD

Sodobna dognanja farmacevtske in biofarmacevtske industrije so podprta z raziskavami, ki proučujejo mehanizme pridobivanja proteinov v produkcijskih organizmih, tako da pridobijo informacije o povečanju izkoristkov na področju industrijske sinteze tako pri klasični fermentaciji kot tudi pri fermentaciji z rekombinantno tehnologijo. Prav izboljšave delovanja posameznih sevov produkcijskih organizmov, kot so *Bacillus brevis*, *E. coli* BL21 in *E. coli* K12, so gonilna sila razvoja in raziskav, dolgoročno gledano pa omogočajo tudi zmanjševanje stroškov. Izbira produkcijskega organizma je tako izjemno pomembna, saj želimo pridobiti čim več aktivnega rekombinantnega proteina, tj. ob čezmernem izločanju proteina nas zanima njegova agregacija in posledična tvorba inkluzijskih teles, iz katerih nato izoliramo tarčni rekombinantni protein, ter njegovo zvijanje v funkcionalno obliko. Za naš primer smo izbrali protein hG-CSF (človeški dejavnik za spodbujanje nastanka kolonij granulocitov).

Protein hG-CSF ima funkcijo centralne imunske obrambe na osnovi nevtrofilcev, saj ima regulatorno vlogo pri rasti, diferenciaciji, preživetju in aktivaciji nevtrofilcev in njihovih prekurzorjev. Predpisujejo ga tudi za okrepitev imunskega sistema pri pacientih s HIV, pljučnico, sladkorno boleznjijo, levkemijo in fibrilno nevtropenijo. Za zdravljenje uporabljajo tri oblike proteina hG-CSF; tj. neglikozilirano obliko z zamenjanimi petimi aminokislinami na N-koncu (nartograstim) (Nakahata in sod., 1998), glikozilirano obliko (lenograstim) in neglikozilirano obliko (filgrastim), ki jo najpogosteje proizvajajo v bakteriji *E. coli* (Vanz in sod., 2008). Poleg teh treh oblik je pomembna še modificirana, pegilirana oblika hG-CSF, tj. Neulasta® (pegfilgrastim), ki jo trži Amgen (<http://www.neulasta.com/>), s podaljšanim delovanjem, kar omogoča manj pogosto injiciranje.

Raziskovanje pridobivanja rekombinantnega proteina hG-CSF v gostiteljski bakteriji *Escherichia coli* BL21 se je začelo pred nekaj leti, ko je sodelavcem z oddelka Nove generacije proteinov podjetja Lek, d. d. (član skupine Sandoz) in Kemijskega inštituta uspelo z biosintezo pri nižji temperaturi (25 °C) dokazati, da se pri tej temperaturi tvorijo t. i. neklašična inkluzijska telesa (nkIT), ki vsebujejo večji odstotek pravilno zvitega prekurzorja proteina hG-CSF (Jevševar in sod., 2005). Ta ugotovitev je bila in je še vedno izjemno pomembna, saj so v nasprotju s klasičnimi inkluzijskimi telesi, ki vsebujejo biološko neaktivnen protein in se v nadaljevanju obdelujejo z agresivnimi denaturanti, čemur sledi renaturacija, neklašična inkluzijska telesa potencial za neposredno ekstrakcijo biološko aktivnega proteina pod milimi nedenaturirajočimi pogoji (Peternel in sod., 2008). Zato so tudi osnova za razvoj naprednejših tehnik za določevanje proteinskih mehanizmov in njihovih izkoristkov.

Da bi poiskali pogoje za učinkovito raziskovanje vloge proteaz in šaperonov ter ostalih sodelujočih proteinov pod različnimi temperaturnimi pogoji, smo si v okviru doktorske naloge pomagali s predhodnimi ugotovitvami (Jevševar in sod., 2005; ter Peternel in sod., 2008), predvsem s področja preučevanja optimalnega števila kopij plazmidov, segregacijske stabilnosti plazmidov, optimalne sestave gojišča, pogojev izražanja, biološke aktivnosti itn.

Do danes je bilo ugotovljeno naslednje:

- Sistem za izražanje pET, ki vsebuje promotor T7 in je pod nadzorom represorja *lacUV*, je zelo primeren sistem za pridobivanje proteina hG-CSF v bakteriji *E. coli*.
- Za pripravo inokuluma pri 25 °C je najprimernejše gojišče LBPG/amp100.
- Inokulum je treba prenesti v sveže produkcijsko gojišče pri OD<sub>600</sub> ≈ 4,0, tj. še preden je dosežena stacionarna faza rasti.
- Gojišče z glukozo GYSP je bilo izbrano in optimirano za produkcijsko fazo, saj omogoča večjo gostoto celic in kar 25 % večjo akumulacijo rekombinantnega proteina v celotnih proteinih. Poleg tega omogoča dohranjevanje z glukozo, kar lahko pomeni višje gostote biomase in s tem višjo proizvodnjo rekombinantnega proteina na en liter brozge.
- Indukcijo heterolognega gena v gojišču GYSP dosežemo z dodatkom IPTG (izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozida) v produkcijsko gojišče na začetku gojenja (Jevševar in sod., 2007).
- Temperatura gojenja 25 °C stabilizira povprečno število kopij plazmidne DNA (Jevševar, 2007) in maksimalno število kopij plazmidov (okrog 100–120) je doseženo po približno 18 urah gojenja v pozni eksponentni fazи rasti (Škulj in sod., 2008).
- Segregacijska stabilnost plazmida je neprimerno večja pri 25 °C kot pri 37 °C (optimalna temperatura za rast bakterije *E. coli*).
- Z znižanjem temperature na 25 °C se akumulacija proteina hG-CSF v celotnih proteinih zviša na 35–40 % (Jevševar, 2007).
- Večina izločenega proteina hG-CSF je v obliki inkluzijskih teles (98 %), od tega jih je skoraj 50 % biološko aktivnih (Jalen, 2005; Peternel in sod., 2008).
- Preostala 2 % izločenega proteina hG-CSF sta v topni oblikih, od tega jih je 30 % biološko aktivnih (Peternel in sod., 2008).

Z izbiro pravega produkcijskega organizma, tj. seva BL21 (DE3) bakterije *E. coli*, ugodnih pogojev, podprtih z že omenjenimi raziskavami sodelavcev za preučevanje dejavnikov, ki vplivajo na izločanje proteina hG-CSF, smo se v okviru doktorskega dela osredotočili na identifikacijo tvorbe nkIT pri treh različnih temperaturah, tj. 25 °C, 37 °C in 42 °C, v povezavi

z izražanjem genov, ki nosijo zapis za različne proteaze in šaperone ter druge sodelujoče proteine. Namen doktorske disertacije je bil potrditi ali ovreči dejstva, da bo pri nižji temperaturi ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aktivnost neke skupine proteaz oziroma izražanje genov, ki nosijo zapis za to skupino proteaz zmanjšano, zato bodo novonastale molekule proteina hG-CSF manj podvržene proteolitski cepitvi, pri višji temperaturi ( $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pa bo aktivnost neke skupine proteaz oziroma izražanje genov, ki nosijo zapis za to skupino proteaz večje, kar bo vplivalo na novonastale molekule proteina hG-CSF, saj bodo bolj nagnjene k proteolitski cepitvi, to pa bo vodilo k nižjim izkoristkom tarčnega proteina. Prav tako bomo pri nižji temperaturi identificirali nekatere gene (ki najverjetneje kodirajo šaperone), ki sodelujejo pri pravilnem zvijanju proteinov.

## 1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- S komercialno dosegljivimi DNA-čipi je mogoče identificirati tiste gene pri bakteriji *E. coli*, katerih izražanje se bistveno spremeni zaradi spremenjene temperature gojenja.
- Pri nižji temperaturi ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) bo izražanje genov, ki nosijo zapis za nekatere proteaze zmanjšano, zato bodo novonastale molekule proteina hG-CSF manj podvržene proteolitski cepitvi, pri višji temperaturi ( $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pa bo izražanje genov, ki nosijo zapis za nekatere proteaze večje, kar bo vplivalo na novonastale molekule proteina hG-CSF, saj bodo bolj nagnjene k proteolitski cepitvi, to pa bo vodilo k nižji akumulaciji tarčnega proteina.
- Pri neoptimalni temperaturi (nizka ali visoka) se spremeni raven izražanja nekaterih genov za glavne šaperone, ki sodelujejo pri pravilnem zvijanju proteinov.
- Ravni mRNA za diferencialno izražene proteaze in šaperone se odražajo tudi v koncentracijah izraženih proteinov.

## 1.2 CILJI DOKTORSKE NALOGE

- Določili bomo profil mRNA pri sevu BL21 bakterije *E. coli*, na osnovi komercialno dosegljivih DNA-čipov.
- Tako bomo identificirali nekatere ključne gene, katerih izražanje se bistveno spremeni zaradi spremenjene temperature gojenja.
- Rezultate bomo biološko interpretirali in potrdili z alternativnimi tehnikami, tako s kvantitativnim PCR kot tudi z analizo koncentracij proteinov (prenos Western).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA

Začetki tehnologije rekombinantne DNA segajo že v začetke sedemdesetih let 20. stoletja in so rezultat desetletja intenzivnih raziskav DNA, RNA in virusov (Stryer, 1995). Ena prvih rekombinantnih molekul DNA, ki je bila izolirana, je bila hibrid med  $\lambda$ -fagom in sesalskim DNA-virusnim genomom SV40. Sledilo je prvo kloniranje evkariontskega gena leta 1974 (Recombinant DNA technology, 1990). Danes se tehnologija rekombinantne DNA uporablja v medicini in diagnostiki genetskih okvar, razvija se aplikativna genska terapija, uporaba pa se širi v kmetijstvo in na ostala področja.

Sama tehnologija rekombinantne DNA je odvisna od uporabe encimov, ki sodelujejo pri rezanju, združevanju in replikaciji DNA ter pri reverzni transkripciji RNA (Stryer, 1995). Pri tem sodelujeta dve pomembni skupini encimov, to so restrikcijske endonukleaze in DNA-ligaze, pomembni pa so tudi vektorji, ki omogočajo vnos genskega materiala v gostiteljsko celico.

#### 2.1.1 Vektorji

Ločimo več vrst vektorjev, od plazmidnih, fagnih, vse do večjih, kot so YAC (umetni kromosom kvasovk) in MAC (umetni sesalski kromosom) (Recombinant DNA technology, 1990). Večinoma so vektorji pripravljeni za namen nošenja gena ali genov, ali pa represorjev, ki povzročajo odmrte celic ob izgubi plazmida (Baneyx, 1999).

Plazmidi so krožne dvojerižne molekule DNA različnih velikosti, ki se naravno pojavljajo v nekaterih bakterijah in se v njih tudi samostojno razmnožujejo. Vsebujejo gene za inaktivacijo antibiotikov, toksinov in razgradnjo ostalih naravnih produktov (Stryer, 1995), omogočajo tudi vključitev tarčnega gena za pridobivanje želenih rekombinantnih proteinov. Poznamo različne vektorske sisteme, ki se med seboj razlikujejo po izvoru, dolžini inserta in možnosti aplikacij (preglednica 1).

**Preglednica 1:** Značilnosti in uporabnost različnih vektorskih sistemov (Recombinant DNA technology, 1990)

**Table 1:** Characteristics of different vectors (Recombinant DNA technology, 1990).

Vektor	Osnova	Velikost inserta	Uporaba
plazmid	naravni plazmidi (veliko število kopij)	$\leq 10$ kb	subkloniranje in zaključni procesi manipulacije, kloniranje in izražanje cDNA
fag	bakteriofag $\lambda$	5–20 kb	kloniranje genomske DNA in cDNA, ekspresijska knjižnica
kozmid	plazmid, ki vsebuje <i>cos</i> del bakteriofaga $\lambda$	35–45 kb	sestava genomske knjižnice
umetni bakterijski kromosom (BAC)	plazmid faktorja F bakterije <i>E. coli</i>	75–300 kb	analiza velikih genomov
umetni kromosom kvasovke (YAC)	centromer, telomer in samostojno pomnoževalna enota	100–1000 kb (1 Mb)	analiza velikih genomov, YAC transgene miši
umetni sesalski kromosom (MAC)	centromer, telomer in mesto ori sesalcev	100 kb do $> 1$ Mb	za uporabo v živalski biotehnologiji in genetskem zdravljenju ljudi

Bakterijski sistemi so eni najbolj priljubljenih, saj jih je zelo enostavno gojiti, zaradi hitre rasti omogočajo visoko produktivnost, majhne stroške in hitro uporabo. Seveda je prava kombinacija izbire primernega gostitelja in promotorskega sistema za tarčni protein bistvena. Tako je na izbiro veliko bakterijskih sistemov specifičnih lastnosti, med njimi so *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli* K12 in *Escherichia coli* BL21.

**Preglednica 2:** Nekaj sevov bakterije *E. coli* z njihovimi značilnostmi (Terpe, 2006)

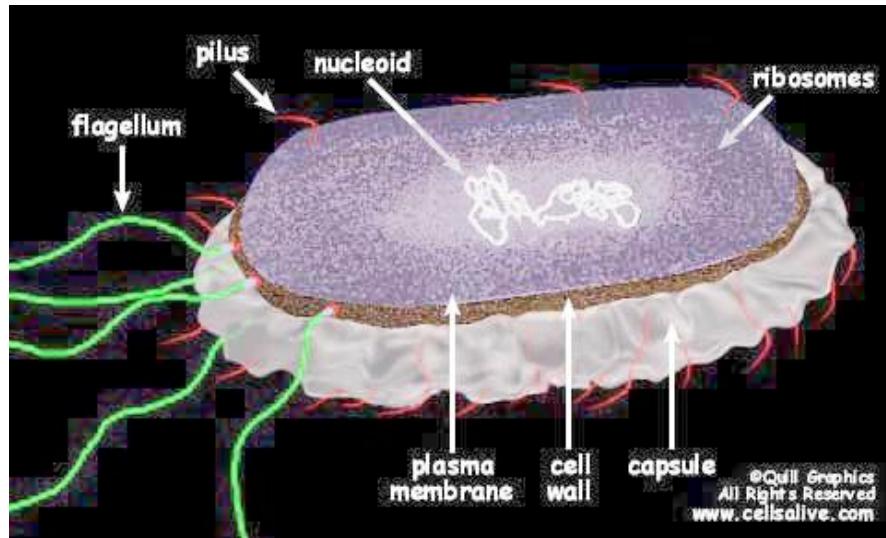
**Table 2:** Some of *E. coli* strains and their characteristics (Terpe, 2006).

Sev <i>E. coli</i>	Značilnosti
AD494 (K12)	mutanta <i>trxR</i> , pospešuje nastanek disulfidnih vezi v citoplazmi
BL21 (B834)	nima genov <i>lon</i> in <i>ompT</i> za proteazi
BLR (BL21)	mutanta <i>recA</i> , stabilizira tandemske ponovitve, nima genov <i>lon</i> in <i>ompT</i> za proteaze
C43 (BL21)	dvojna mutanta, primerna za izražanje membranskih proteinov
Origami (K12)	mutanta <i>trxR/gor</i> , pospešuje tvorbo disulfidnih vezi v citoplazmi
Origami B (BL21)	mutanta <i>trxR/gor</i> , pospešuje tvorbo disulfidnih vezi v citoplazmi, nima genov <i>lon</i> in <i>ompT</i> za proteazi
Rosetta (BL21)	pospešuje ekspresijo evkariontskih proteinov, ki vsebujejo redko uporabljene kodone bakterije <i>E. coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC in GGA, nima genov <i>lon</i> in <i>ompT</i> za proteazi

Eden najbolj uporabljenih organizmov za sintezo heterolognih proteinov je gramnegativna bakterija *E. coli*. Razlog je prav to, da je najbolj poznana in uporabljena skoraj v vsakem laboratoriju tako v industriji kot na farmacevtski ravni (Terpe, 2006). Zato so razvili različne seve te bakterije (preglednica 2).

## 2.2 BAKTERIJA *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) je gramnegativna bakterija, ki za gibanje uporablja po telesu razporejene flagele (slika 1). Je fakultativno anaeroben kemoorganotrof, katerega metabolizem sodeluje pri respiraciji in fermentaciji (Jeong in sod., 2009). Za genom bakterije *E. coli* predpostavlja, da kodira 4333 odprtih bralnih okvirjev (ORF) (Rajagopala in sod., 2010) in vsaj 115 stabilnih molekul RNA (danes že več kot 156), vendar kljub intenzivnim večdesetletnim raziskavam več kot 30 % ORF-ov nima znanih funkcij delovanja (Richmond in sod., 1999; Riley in sod., 2006).



**Slika 1:** Bakterijska celica (z leve proti desni: zgoraj: biček, pilus (lasasti izrastek), jedro in ribosomi; spodaj: celična membrana, celična stena in kapsula (glikokaliks)) (Cells alive, 2010)

**Figure 1:** Bacteria (from right to left: above: flagellum, pilus, nucleoid and ribosomes; below: plasma membrane, cell wall and capsule) (Cells alive, 2010).

Glavna komponenta celične stene gramnegativne bakterije so lipopolisaharidi. Sestavni del celične stene so tudi fosfolipidi, proteini, lipoproteini in manjše koncentracije peptidoglikanov. Lipopolisaharidi vsebujejo osrednji del, na katerega so vezane ponovitve polisaharidnih molekul (Gram negative bacteria, 2012). Le-te so povezane z endotoksično aktivnostjo (Terpe, 2006). Osrednji del so fosforiliran 2-keto-3-deoksioktonoat, fosforilirana L-glicero-D-manoheptoza, D-galaktoza, D-glukoza in N-acetilglukozamin (Gram negative bacteria, 2012).

### 2.2.1 Sev B bakterije *E. coli*

Sev B bakterije *E. coli* je raziskovalni model za preučevanje fagne občutljivosti, sistemov restrikcij in modifikacij, evolucije bakterij in izražanja proteinov v raziskovalnih laboratorijih in biotehnološki industriji. Značilnosti seva B, kot so odsotnost nekaterih proteaz, nizka proizvodnja acetata pri visoki prisotnosti glukoze in povečana permeabilnost kot posledica enostavne celične površine, omogočajo njegovo pogosto uporabo za pridobivanje rekombinantnih proteinov. Poznamo več različic seva B bakterije *E. coli* (preglednica 2). Najpogosteje uporabljen sev je BL21 (DE3) z odstranjenim delom genov, ki nosijo zapis za sestavne dele flagelarnega sistema, DNA-citozin metilaze, ter genov *ompT* in *lon*. Sev BL21

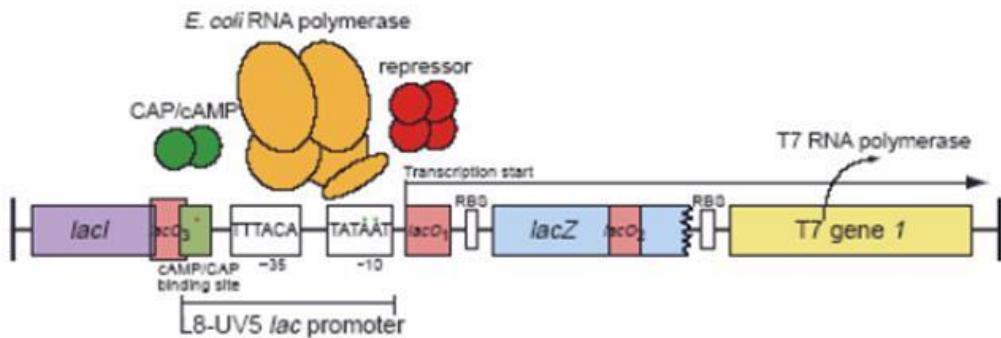
(DE3) prav tako nosi rekombinantni profag DE3, v katerem je RNA-polimerazni gen T7, ki je osnova za visoko izražanje heterolognih genov pod kontrolo promotorja T7 (Jeong in sod., 2009). Izražanje heterolognega gena je v primeru sistemov T7 regulirano posredno, z regulacijo izražanja RNA-polimeraze T7 z represorjem lac UV.

## 2.2.2 Promotorji

Promotorji so orodja za izražanje genov. V biotehnologiji je uporaben predvsem promotor, ki je pod močnim nadzorom, lahko prenosljiv med različne seve *E. coli*, z enostavno in stroškovno ugodno indukcijo (Terpe, 2006). Začetek prepisovanja (transkripcije) na DNA-matrici je odvisen prav od promotorja. Eden najpomembnejših regulacijskih mehanizmov bakterije *E. coli* je povezan z izkoriščanjem laktoze, saj je bilo veliko promotorjev oblikovanih na podlagi laktoznega promotorja, tj. promotorja *lac*, ki ga redko uporabljajo za visoko izražanje rekombinantnih proteinov. Poleg *lac* je še več drugih podobnih promotorjev, npr. promotorja *tac* in *trc*.

### 2.2.2.1 RNA-polimerazni sistem T7

Prednost RNA-polimeraze T7 je v kar petkrat hitrejšem podaljševanju verige kot v primeru RNA-polimeraze bakterije *E. coli*. Ker polimerazi prepoznavata različne promotorje, je to omogočilo večjo selektivnost in s tem povečano izražanje rekombinantnih proteinov. V sevu bakterije *E. coli* BL21 (DE3) je gen, ki kodira RNA-polimerazo T7, pod vplivom promotorja *lac*, tj. promotorja *lac* UV5 (slika 2), ki vsebuje točkovne mutacije na regiji -10, kar povečuje moč promotorja in zmanjšuje njegovo odvisnost od cAMP. Naslednja točkovna mutacija pa povzroča manjšo občutljivost promotorja na glukozo, kar omogoča močnejšo indukcijo izražanja RNA-polimeraze T7 z IPTG celo v prisotnosti glukoze (Terpe, 2006).

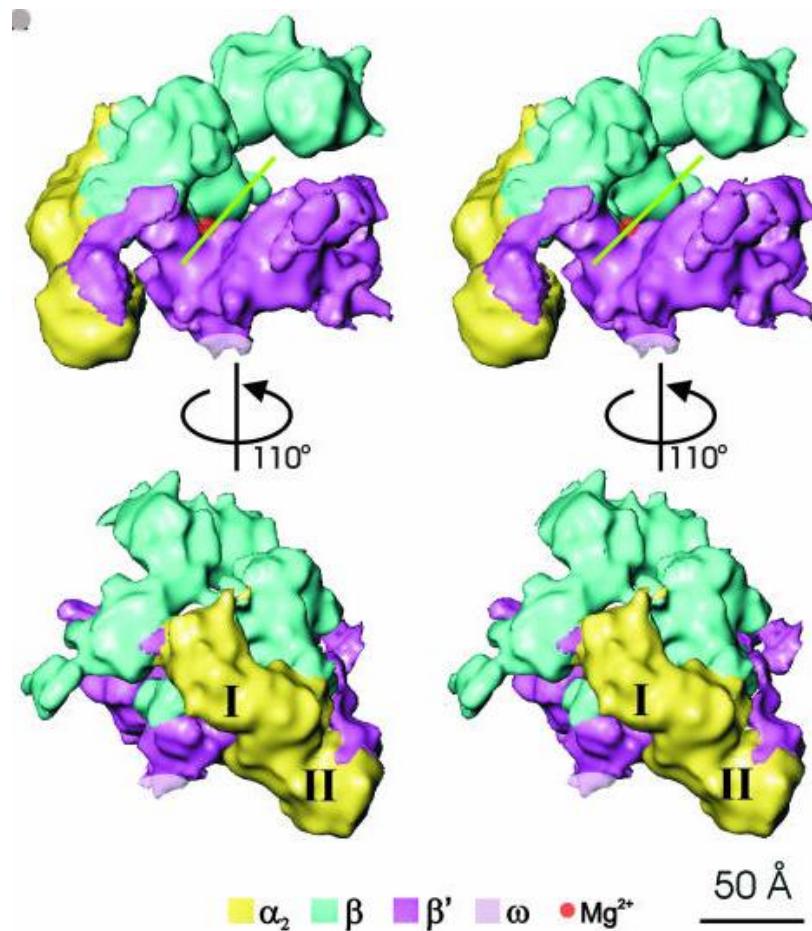


**Slika 2:** Nadzor prepisovanja gena za RNA-polimerazo T7, vključenega prek profaga v bakteriji *E. coli* BL21 (Novy in Morris, 2001)

**Figure 2:** Transcriptional control of T7 gene (Novy and Morris, 2001).

### 2.3 PROKARIOTNSKA RNA-POLIMERAZA

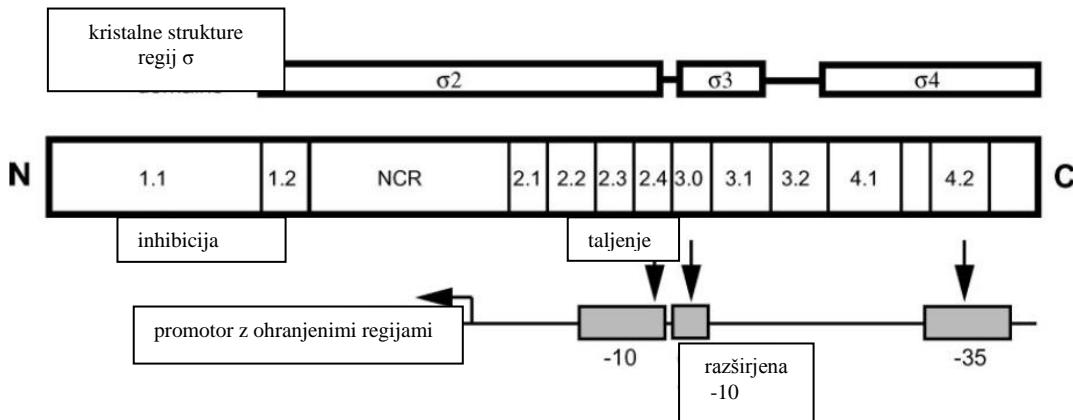
Od DNA odvisna RNA-polimeraza (RNAP) je osrednji encim genskega izražanja in regulacije. Osrednji encim RNAP bakterije *E. coli* vsebuje 5 podenot:  $\beta'$  (1407 aminokislin),  $\beta$  (1342 aminokislin), dimer  $\alpha$  (329 aminokislin) in podenota  $\omega$  (91 aminokislin). Osrednja RNAP je sicer katalitsko učinkovita, vendar samostojno nezmožna začetka transkripcije z vezavo na promotorje (Borukhov in Severinov, 2002). Tu vlogo prevzamejo podenote  $\sigma$ . Podenote  $\sigma$  z vezavo na RNAP tvorijo holoencim RNAP, ki prepoznavata promotorje in je odgovoren za začetek transkripcije (Borukhov in Severinov, 2002; ter Gruber in Gross, 2003). Velikost holencima je približno 465 kDa. Podenoti  $\beta$  in  $\beta'$  skupaj tvorita katalitski center, podenota  $\alpha$  je potrebna za sestavljanje osrednjega encima in sodeluje pri prepoznavanju promotorjev (Lewin, 1997), podenota  $\omega$  pa je navita okoli C-konca podenote  $\beta'$ , s čimer stabilizira njen povezavo s trimerom  $\alpha_2\beta$  (Borukhov in Severinov, 2002) (slika 3).



**Slika 3:** Osrednji encim prokarionske RNA-polimeraze, kjer so barvno prikazane posamezne podenote (Finn in sod., 2000)

**Figure 3:** RNA polymerase enzyme (Finn et al., 2000).

Glavna podenota  $\sigma$  v bakteriji *E. coli* je  $\sigma^{70}$  (sigma 70), ki predstavlja 70 kDa velik protein, sestavljen iz 4 regij in njihovih podregij (slika 4), ki so odgovorni za vezavo na RNAP in DNA. Družina proteinov sigma 70 (proteini, katerih zaporedje in struktura aminokislin sta podobna zaporedju in strukturi aminokislin proteina sigme 70) je razdeljena v naslednje skupine: skupino 1, ki vsebuje sigmo 70 in njene ortologe (odgovorni za transkripcijo vzdrževalnih genov); skupino 2, ki je sorodna skupini 1 in ni pomembna za rast (najpomembnejši predstavnik je  $\sigma^S$ ); skupino 3, ki je odgovorna za odzive na temperaturni stres, flagelarno biosintezo in sporulacijo; skupino 4, ki sodeluje pri transportu in regulaciji celične površine; itn.



**Slika 4:** Regije podenot sigma in njihove naloge. V srednjem delu slike so podrobnejše prikazane štiri ohranjene regije s podregijami (1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 3.0, 3.1, 3.2, 4.1 in 4.2) ter neohranjena regija (NCR). V zgonjem delu je prikazana znana kristalna struktura v srednjem delu omenjenih regij ( $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$  ter  $\sigma_4$ ), v spodnjem delu pa promotor z ohranjenimi regijami -35, -10 ter podaljšana regija -10 (Gruber in Gross, 2003).

**Figure 4:** Sigma regions and their roles. The four conserved regions with their subregions (1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 3.0, 3.1, 3.2, 4.1 and 4.2) as well as the nonconserved region (NCR) are indicated (linear representation). A schematic of a promoter with conserved regions -35, -10 and extended -10 from the start site is shown below the linear representation. The crystallized domains of  $\sigma$  ( $\sigma_2$ ,  $\sigma_3$  and  $\sigma_4$ ) are indicated above the linear representation (Gruber and Gross, 2003).

Regiji 2.4 in 4.2, ki sta odločilni za vezavo na DNA, prepoznavata heksamere  $-10$  in  $-35$  promotorja (pri tem sodeluje tudi regija 3.0) (slika 4, puščice). Regija 1.1 je samo v skupini sigma 1, kjer deluje kot samostojno inhibicijsko področje vezave na DNA, medtem ko je regija 2.3 odgovorna za denaturacijo dvojne vijačnice DNA. Področje 2 reagira z regijo  $-10$  promotorja, področje 3 prek enega od treh heliksov prav tako z regijo  $-10$  promotorja, medtem ko področje 4 reagira z regijo  $-35$  promotorja in vsebuje determinanto za vezavo RNAP (slika 4, puščice).

*E. coli* torej vsebuje 6 faktorjev sigma družine  $\sigma^{70}$ :  $\sigma^{70}$  (sigma 70/RpoD),  $\sigma^S$  (sigma S/RpoS),  $\sigma^{32}$  (sigma 32/RpoH),  $\sigma^F$  (sigma F/FliA),  $\sigma^E$  (sigma E/RpoE) in FecI (Gruber in Gross, 2003), ter faktor sigma  $\sigma^{54}$  (sigma 54/RpoN) (Lewin, 2011). Faktorji  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^E$ ,  $\sigma^F$  in  $\sigma^{54}$  se aktivirajo kot odgovor na vplive iz okolja (Lewin, 1997), FecI pa se aktivira ob pomanjkanju železa in ob prisotnosti železovega citrata (Gruber in Gross, 2003).

**Preglednica 3:** Faktorji sigma družine  $\sigma^{70}$  bakterije *E. coli* (Lewin, 1997, Helmann, 2001; ter Typass in Hengge, 2006)

**Table 3:** *E. coli* sigma factors of  $\sigma^{70}$  family (Lewin, 1997, Helmann, 2001 and Typass and Hengge, 2006).

Gen	Velikost	Uporaba/aktivacija	Regija -10	Regija -35
<i>rpoD</i>	70 kDa	kontrola vzdrževalnih (hišnih) genov	TATAAT	TTGACA
<i>rpoH</i>	32 kDa	temperaturni stres	CCCGATNT	CCCTTGAA
<i>rpoE</i>	24 kDa	temperaturni stres	ni poznana	ni poznana
<i>rpoN</i>	54 kDa	pomanjkanje dušika	TTGCA	CTGGNA
<i>rpoS</i>	38 kDa	prilagoditev stacionarni fazi	TTCTCA	TACGCT
<i>fliA</i>	28 kDa	sinteza flagelov	GCCGATAA	CTAAA

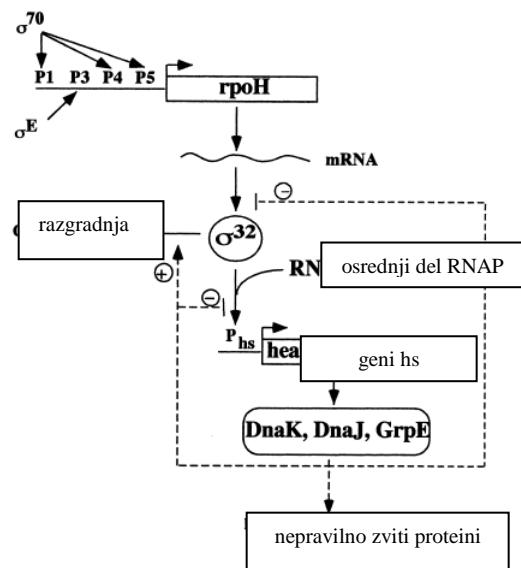
Transkripcija se v bakteriji *E. coli* po navadi spremeni ob temperaturnem stresu, ki je posledica dviga temperature. To povzroča spremembe v nastajanju obstoječih proteinov in sintezo novih proteinov, ki so produkt t. i. genov *hsr*. Ob tem pride do indukcije sigme 32 in sigme E. Ob pomanjkanju dušika se aktivira sigma 54, sigma F aktivira kemotakso in sintezo genov, odgovornih za flagelarne strukture (Lewin, 1997), medtem ko je sigma S izjemno pomembna v stacionarni fazi (Typass in Hengge, 2006) (preglednica 3). Temperaturni stres je izrednega pomena za preučevanje sprememb transkripcije v bakteriji *E. coli*, saj vpliva na izražanje vrste njenih genov, med drugim tudi na izražanje genov, ki nosijo zapis za šaperone in proteaze, ki so pomembne tudi v produkciji rekombinantnih proteinov.

## 2.4 TEMPERATURNI STRES

Kot smo že omenili, se vsi organizmi odzovejo na stresne vplive iz okolja, kot sta etanol ali temperatura, s hitrim pospeševanjem sinteze skupine proteinov, ki jim pravimo proteini temperaturnega stresa (Hsp; angl. *heat shock proteins*; Schumann, 1995). K Hsp uvrščamo med drugim šaperone in proteaze (Ron in sod., 1999). Prav indukcija omenjenih proteinov je za posamezen organizem pomemben zaščitni mehanizem pred stresnimi vplivi (Schumann, 1995). V bakteriji *E. coli* tako proteini Hsp pri 30 °C predstavljajo manj kot 2 % celotnih proteinov, pri 46 °C pa kar 20–25 % celotnih proteinov. V nekaterih vrstah bakterij je bila za proteine Hsp dokazana pomembna vloga v patogenezi in preživetju znotraj makrofaga, prav tako so pomembni v stacionarni fazi rasti. Odziv hsr (angl. *heat shock response*; odzivnost,

imenovana odgovor na temperaturni stres – poimenovanje je tako definirano, saj je bilo identificirano v povezavi s temperaturnim stresom) bakterije ima pod nadzorom več kot 100 genov, ki kodirajo šaperone, proteaze in ostale regulatorne proteine (Ron in sod., 1999; Arifuzzaman in sod., 2006; podatkovna zbirka EcoCyc, 2010).

V bakteriji *E. coli* je odziv hsr na transkripcijski ravni pod kontrolo produkta gena *rpoH*, tj. podenote  $\sigma^{32}$  RNA-polimeraze, ki se inducira ob nenadnem zvišanju ravni  $\sigma^{32}$  ter njene aktivnosti (Arsene in sod., 2000) (slika 5). Če ni temperaturnega stresa, se  $\sigma^{32}$  razgradi pod vplivom delovanja proteaze HflB (kodira jo gen *hflB/ftsH*) (Ron in sod., 1999), ob temperaturnem stresu pa se  $\sigma^{32}$  stabilizira (Straus in sod., 1987).



**Slika 5:** Regulon hs (angl. *heat shock*) bakterije *E. coli*: Transkripcija gena *rpoH* zajema najmanj štiri promotorje, od katerih en uporablja alternativni faktor  $\sigma^{24}$ . Odziv hsr se inducira kot posledica zvišanja ravni izražanja  $\sigma^{32}$  (povečanje translacije mRNA gena *rpoH*), stabilizacije  $\sigma^{32}$  in inaktivacije represorja  $\sigma^{32}$ . Proteini Hsp DnaK, DnaJ in GrpE so negativni modulatorji, ki povzročajo represijo mRNA-translacija gena *rpoH*, učinkovito razgradnjo in represijo  $\sigma^{32}$ -aktivnosti (Arsene in sod., 2000).

**Figure 5:** The hs (heat shock) regulon of *E. coli*: transcription of *rpoH* involves at least four promoters, one of which utilizes the alternative  $\sigma^{24}$  factor. The heat shock response is induced as the result of an increase in  $\sigma^{32}$  levels, primary due to increases in translation of *rpoH* mRNA, stabilization of  $\sigma^{32}$ , and derepression of  $\sigma^{32}$  activity. The DnaK, DnaJ and GrpE heat shock proteins act as negative modulators by mediating repression of *rpoH* mRNA translation, efficient degradation of  $\sigma^{32}$ , and repression of  $\sigma^{32}$  activity (Arsene et al., 2000).

**Preglednica 4:** Nekateri znani geni *hsr* bakterije *E. coli*, ki so pod kontrolo faktorja  $\sigma^{32}$  in imajo znano funkcijo (Schumann, 1996; ter Zhao in sod., 2005)

**Table 4:** Some of the known *hsr* genes of *E. coli* that are under control of  $\sigma^{32}$  factor (Schumann, 1996 and Zhao et al., 2005).

Gen	Ime proteina/funkcija
<i>htpY</i>	HtgA/regulacija odziva hsr
<i>dnaK</i>	DnaK/šaperon
<i>dnaJ</i>	DnaJ/košaperon
<i>clpP</i>	ClpP/podenota proteaze ClpXP in ClpAP
<i>clpX</i>	ClpX/podenota proteaze ClpXP
<i>lon</i>	Lon/od ATP odvisna proteaza
<i>htpG</i>	HtpG/šaperon
<i>grpE</i>	GrpE/košaperon
<i>clpB</i>	ClpB/proteoliza
<i>rpoD</i>	RpoD/sigma faktor
<i>ftsH</i>	FtsH/od ATP-odvisna proteaza
<i>ibpA</i>	IbpA/sodeluje pri tvorbi IT
<i>ibpB</i>	IbpB/sodeluje pri tvorbi IT
<i>htrC</i>	HtrC/proteoliza
<i>lysU</i>	LysU/lizil -tRNA sintetaza II
<i>groES</i>	GroES/košaperon
<i>groEL</i>	GroEL/šaperon

Najpogosteje preučevani proteini Hsp, ki so aktivni ob odzivu hsr, so molekulski šaperoni GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE, HtpG, IbpA in IbpB, najbolj preučevane proteaze pa ClpP, ClpX, Lon, HtrC, HflB, HslV in HslU (Chuang in Blatner, 1993; Rosen in sod., 2002; Arifuzzaman in sod., 2006; Jeong in sod., 2009) (slike 6–11 in preglednica 4).

## 2.5 ŠAPERONI IN PROTEAZE

Do zdaj so že poročali, da je aktivnost proteaz odvisna od temperature rasti (Laskowska in sod., 1996; Gottesman, 1996) in da je vloga šaperonov izrednega pomena pri hsr-odzivnosti bakterije *E. coli* (Jubete in sod., 1996; ter Guisbert in sod., 2004).

Proteoliza v bakteriji *E. coli* služi kot sistem odstranjevanja celic z nepravilno zvitimi proteini oz. proteini nepravilnih oblik ter kot limita časa in količine dostopnosti kritičnih regulatornih proteinov (Gottesman, 1996). Po drugi strani odziv hsr vodi v indukcijo univerzalno

ohranjenih genov *hsr*, ki kodirajo šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine (Guisbert in sod., 2004).

Zato je pri tem pomembno, da se v bakteriji *E. coli* na začetku vsi proteini sintetizirajo v citoplazmi, ki gredo nato po poti, odvisni od njihove zadnje postaje znotraj celice. To pomeni, da se veliko proteinov, namenjenih v periplazmo, sintetizira kot prekurzorji, ki imajo na N-koncih zaporedja, ki jih usmerjajo v splošni sekrecijski aparat v notranji membrani. Po translokaciji in odstranitvi N-končnega zaporedja se novi eksportirani zreli proteini pravilno zvijejo in sestavijo v periplazmi. Vzdrževanje kontrole kvalitete nad omenjenim mehanizmom pa je odvisno od šaperonov in katalizatorjev, ki sodelujejo pri zvitju in proteaz (Miot in Betton, 2004). Povedano z drugimi besedami, celični sistem, ki se ukvarja z *de novo* zvitjem proteinov in kontrolo kvalitete zvitja, sestavlja molekulski šaperoni (npr. DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL in GroES, HtpG, IbpA in IbpB ...) in proteaze (npr. ClpX, ClpP, HslU, HslV, Lon in FtsH) (Rosen in sod., 2002).

### 2.5.1 Šaperoni

Celično preživetje je odvisno od vzdrževanja ustreznega okolja za zvijanje proteinov (Guisbert in sod., 2004). Zvijanje proteinov pa je proces, pri katerem se linearna informacija aminokislinskega zaporedja polipeptida pretvori v 3D-konformacijo funkcionalnega proteina.

Včasih je veljalo, da so šaperoni (preglednica 5) skupina nepovezanih proteinov, ki sodelujejo pri pravilnem zvijanju drugih proteinov, sami pa niso del končnih funkcionalnih struktur. Danes je znano, da so šaperoni proteini, ki se vežejo in stabilizirajo nestabilni konformer drugega proteina. Z nadzorovano vezavo in sproščanjem proteina nadzorujejo njegovo usodo v obliki zvijanja, združevanja, transporta do drugega celičnega predela ali v obliki odstranitve z razgradnjo. V samih šaperonih ni sterične informacije, ki bi bila specifična za pravilno zvitje, ampak preprečujejo nepravilne interakcije znotraj nefunkcionalnih polipeptidov in med njimi, kar vodi samo v povečan izkoristek reakcij zvijanja (Hartl, 1996; in Hartl in sod., 2011).

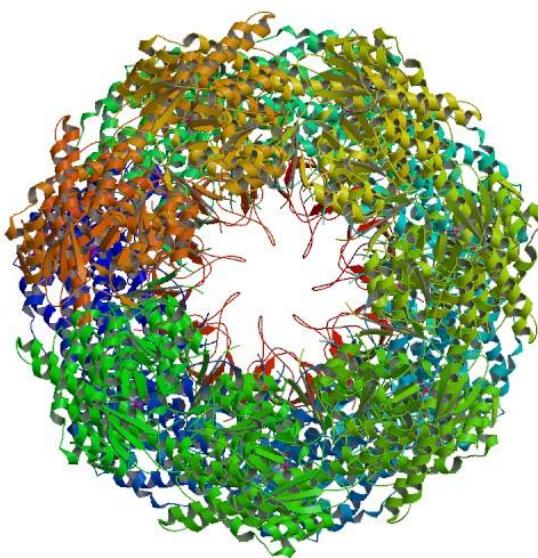
**Preglednica 5:** Prikaz nekaterih najpomembnejših šaperonov in njihove lokacije v bakteriji *E. coli* (Hartl, 1996; Guisbert in sod., 2004; ter Hartl in sod., 2011)

**Table 5:** Some of the most important chaperones of *E. coli* and their cellular location (Hartl, 1996, Guisbert et al., 2004 and Hartl et al., 2011).

Šaperon	Predel nahajanja	Funkcija
DnaK ( $\approx 70$ kDa)	citosol	veže podaljšane peptide, reagira z DnaJ in GrpE
DnaJ ( $\approx 40$ kDa)	citosol	veže nezvite proteine, reagira z DnaK in pospešuje hidrolizo ATP
GrpE ( $\approx 20$ kDa)	citosol	faktor za izmenjavo nukleotidov z DnaK
sistem GroEL-GroES (GroEL in GroES)	citosol	veže intermediate, ki so odgovorni za zvijanje proteinov

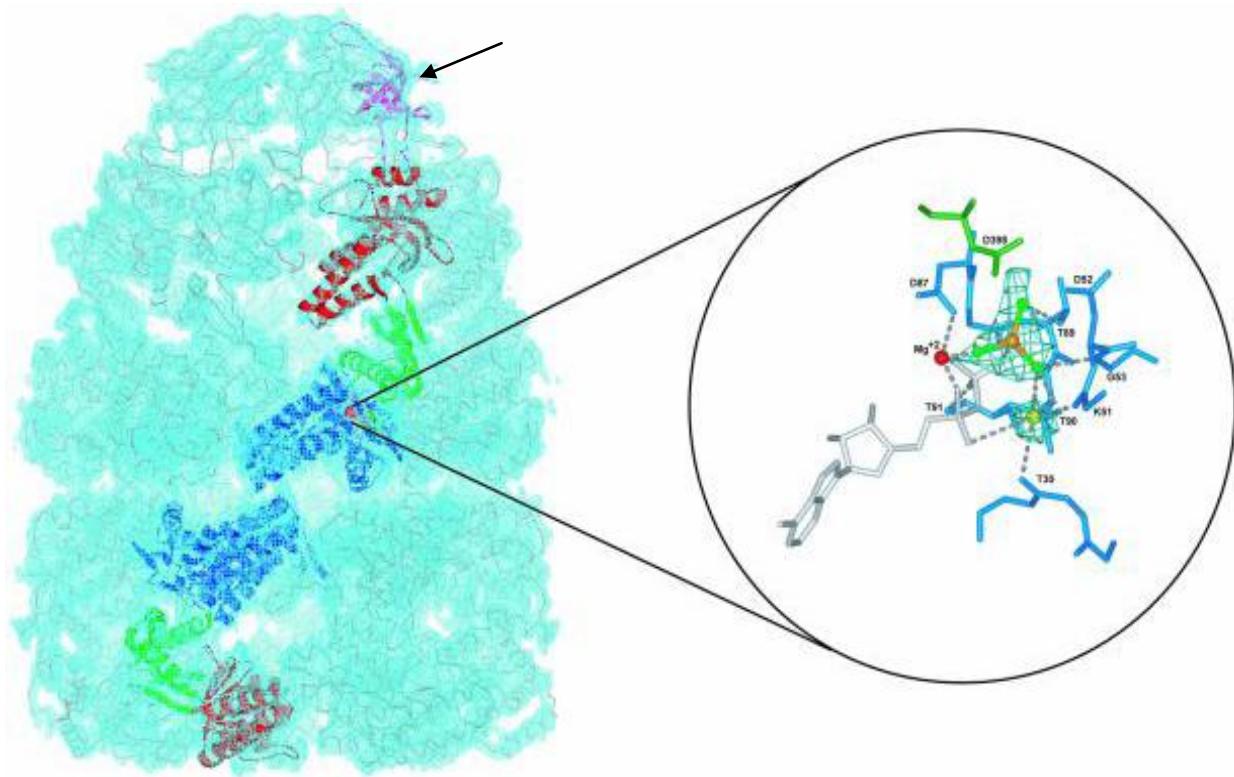
### 2.5.1.1 Sistem GroEL-GroES

Proteina GroEL in GroES kodirata gena *groEL* in *groES*, ki sestavlja operon *groE*. Znotrajcelične ravni obeh proteinov se povečujejo z zviševanjem temperature prek regulacije transkripcije gena *rpoH*. GroES in GroEL sta reda velikosti  $\approx 10$  kDa in  $\approx 60$  kDa (Fayet, 1988; in Hartl, 1996). Delovanje kompleksa proteinov GroEL in GroES znotraj celice je v pomoč ostalim proteinom pri njihovem pravilnem zvijanju s procesom, odvisnim od molekul ATP (Li in sod., 2010). Primer strukture kompleksa molekule GroEL-GroES je prikazan na slikah 6 in 7. Na sliki 7 je dodatno prikazana stabilizacija kompleksa GroEL-GroES z vezavo molekule ATP in AlF<sub>3</sub>. AlF<sub>3</sub> poveže aminokislinske ostanke v fosfatni vezavni zanki (aminokislinski ostanki 87–91, DGT<sub>3</sub>) prek vodikovih vezi s stransko verigo Thr89 in Thr90. Pri tem sodeluje tudi ion K<sup>+</sup>, katerega pomembna vloga je v koordinaciji stabilizacije vezave s fluoridnim ligandom AlF<sub>3</sub>. Vloga iona K<sup>+</sup> je tudi aktivacija ATPazne aktivnosti molekule GroEL (Chaudhry in sod., 2003).



**Slika 6:** Struktura kompleksa GroEL-GroES (Chaudhry in sod., 2003; ter zbirka proteinskih struktur PDB (identifikacija: 1PCQ)

**Figure 6:** Structure of the GroEL - GroES complex (Chaudhry et al., 2003 and Protein Data Bank, PDB ID: 1PCQ).

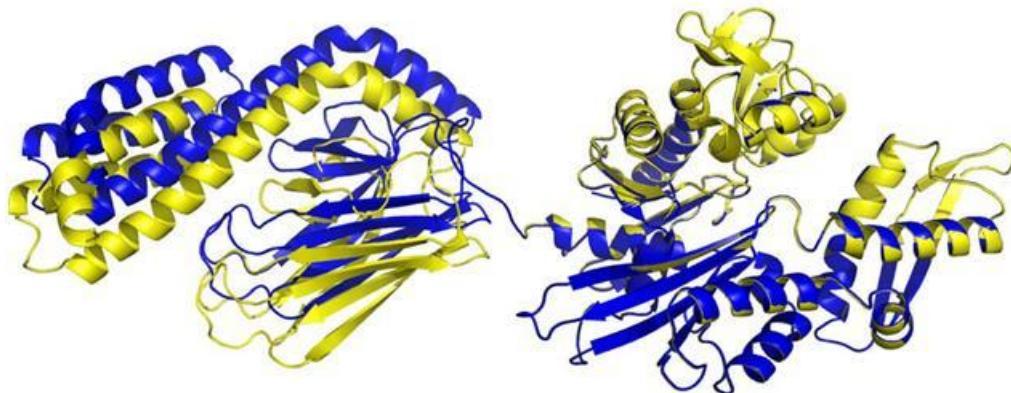


**Slika 7:** Prikaz kompleksa GroEL-GroES-ADP\*AlF3; v zgornjem predelu je viden GroES (roza obarvano – puščica prikazuje eno od podenot), ADP je bele barve, ion Mg<sup>2+</sup> je obarvan rdeče, ion K<sup>+</sup> je rumene barve, AlF<sub>3</sub> pa je prikazan z oranžno (Chaudhry in sod., 2003).

**Figure 7:** The GroEL-GroES-ADP\*AlF3 complex; the GroES subunit is shown in magenta, ADP is white, Mg<sup>2+</sup> is a red sphere, K<sup>+</sup> is a yellow sphere, and the trigonal AlF3 is shown in orange colour (Chaudhry et al., 2003).

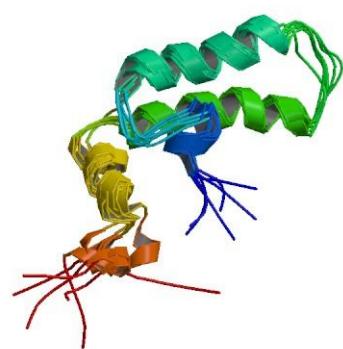
#### 2.5.1.2 Sistem DnaK – DnaJ – GrpE

Proteina DnaK (slika 8) in DnaJ (slika 9) skupaj vzdržujeta nepravilno zvit polipeptid v topni konformaciji, pripravljeni za zvijanje in transport do proteina GroEL, ki nato prispelemu proteinu pomaga pri zvijanju v nativno obliko. Nukleotid – izmenjevalni faktor GrpE (slika 10) pospešuje sprostitev molekule ADP z molekule DnaK, kar lahko povzroči sprostitev molekule DnaJ iz ternarnega kompleksa (Hartl, 1996). Kompleksa GroELS in DnaKJ delujeta sinergistično pri preprečevanju tvorbe agregatov (Gragerov in sod., 1992).



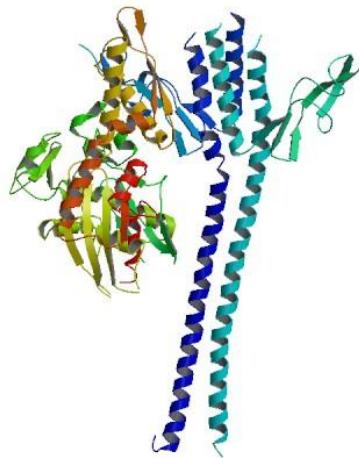
**Slika 8:** Prikaz strukture hibridne molekule DnaK (1-605, modro) in divjega tipa DnaK (1-638, rumeno) v kompleksu s substratom NRLLLTG in z ADP. DnaK sestavlja dve glavni molekulski domeni; tj. 44 kDa velika N-končna domena molekule za vezavo nukleotidov (NBD), ki izkazuje ATPazno aktivnost, ter 25 kDa velika domena z vezavnim mestom za substrat (SBD) (Bertelsen in sod., 2009; ter zbirka proteinskih struktur PDB (identifikacija: 2KHO).

**Figure 8:** Structure of hybrid DnaK molecule (1–605, blue) and wild type *E. coli* DnaK (1–638, yellow). Both molecules have ADP, orthophosphate, and the substrate peptide NRLLLTG bound. DnaK comprises two main domains: a 44-kDa N-terminal nucleotide-binding domain (NBD) that contains ATPase activity, and a 25-kDa substrate-binding domain (SBD) that harbors the substrate-binding site (Bertelsen et al., 2009 and Protein Data Bank, PDB ID: 2KHO).



**Slika 9:** Struktura molekule DnaJ (prikazan je N-konec aminokislinskih ostankov (1–104), ki je odgovoren za aktivnost (Huang in sod., 1999; ter zbirka proteinskih struktur PDB – identifikacija: 1BQZ)

**Figure 9:** DnaJ molecule N-terminal part end (amino acid residues 1 – 104) responsible for activity (Protein Data Bank, PDB ID: 1BQZ).



**Slika 10:** Struktura molekule GrpE, vezane na ATPazno domeno DnaK bakterije *Escherichia coli*. Dimer proteina GrpE se asimetrično veže na eno molekulo DnaK. Na dimeri GrpE (levi del kompleksa – rdeča, zelena in rjava  $\alpha$ -vijačnica ter zeleni, rjavi, rumeni in modri  $\beta$ -trakovi) sta vezani dve dolgi  $\alpha$ -vijačnici (desni del kompleksa) (Harrison in sod., 1997; ter zbirka proteinskih struktur PDB (identifikacija: 1DKG)).

**Figure 10:** The crystal structure of the adenine nucleotide exchange factor GrpE in complex with the adenosine triphosphatase (ATPase) domain of *Escherichia coli* DnaK. A dimer of GrpE binds asymmetrically to a single molecule of DnaK. Two long alpha helices (right part of the complex) extend away from the GrpE dimer (left part of the complex (red, green and brown  $\alpha$ -helices and green, brown, yellow and blue  $\beta$ -sheet) (Harrison et al., 1997 and Protein Data Bank, PDB ID: 1DKG).

## 2.5.2 Proteaze

S proteolizo se v bakteriji *E. coli* odstranjujejo proteini, ki so nepravilnih oblik ali so nepravilno zviti. Večino znotrajcelične proteolize regulirajo od energije odvisne proteaze, kot so Lon, ClpXP in druge, med katerimi je najpomembnejša HflB (FtsH) (preglednica 6), tako da prek svojih ATP-vezavnih področij prepoznavajo substrate. Pomembna vloga proteaz je tudi sodelovanje pri sprožitvi SOS-signala in vzdrževanju celičnega ravovesja (Gottesman, 1996).

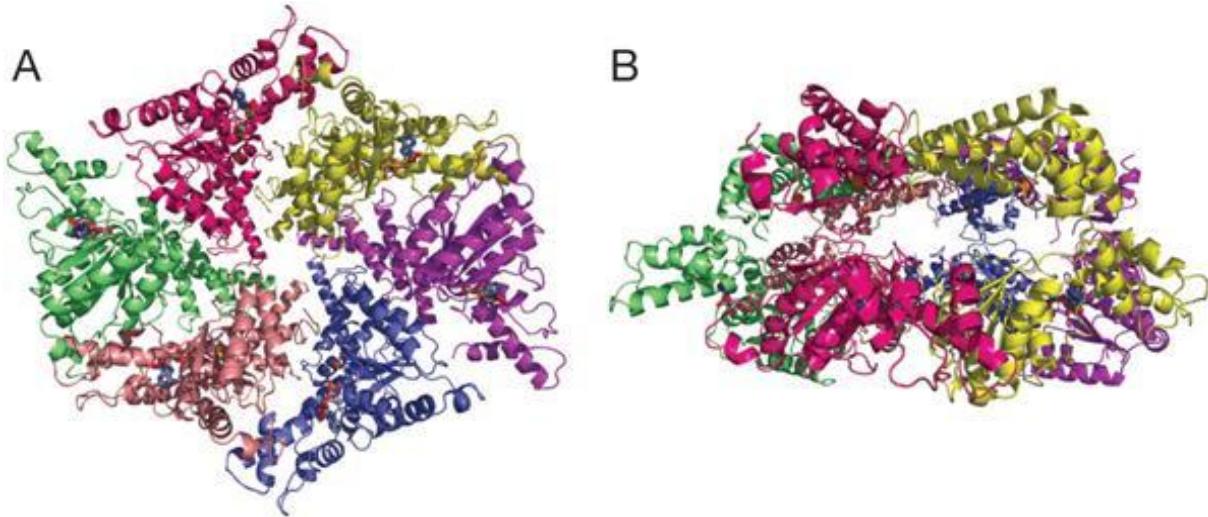
**Preglednica 6:** Nekaj proteaz bakterije *E. coli* glede na lokacijo v celici (Gottesman, 1996; ter Molecular Cell Biology, 2012)

**Table 6:** Some of *E. coli* proteases (Gottesman, 1996 and Molecular Cell Biology, 2012).

Citoplazma		
Proteinaza	Gen	Promotor pod kontrolo
Lon (La)	<i>lon</i>	$\sigma^{32}$ , $\sigma^{70}$
ClpP	<i>clpP</i>	$\sigma^{32}$ , $\sigma^{70}$
ClpX	<i>clpX</i>	<i>clpP</i>
HslV (ClpQ)	<i>hslV</i>	$\sigma^{32}$ , $\sigma^{70}$
HslU (ClpY)	<i>hslU</i>	<i>hslV</i>
HflB (FtsH)	<i>hflB</i>	$\sigma^{32}$ , $\sigma^{70}$
Citoplazemska membrana		
Proteinaza	Gen	Promotor pod kontrolo
Lep B	<i>lepB</i>	<i>lepA</i>
DegS	<i>hhoB</i>	/
SohB	<i>sohB</i>	/
Periplazma		
Proteinaza	Gen	Promotor pod kontrolo
DegP (HtrA)	<i>degP</i>	$\sigma^E$
DegQ	<i>hhoA</i>	/
Zunanja membrana		
Proteinaza	Gen	Promotor pod kontrolo
OmpT	<i>ompT</i>	/

### 2.5.2.1 Od ATP-odvisna metaloproteaza FtsH

Proteaza FtsH je membranski protein (slika 11), ki ima pomembno vlogo pri kontroli kakovosti razgradnje nepotrebnih ali poškodovanih membranskih proteinov, hkrati pa vpliva na delovanje  $\sigma^{32}$  (Bieniossek in sod., 2006; in Langlotz in sod., 2012). Proteaza FtsH vsebuje rahlo spremenjeno ATPazno domeno in Zn proteazni motiv (Gottesman, 1996).

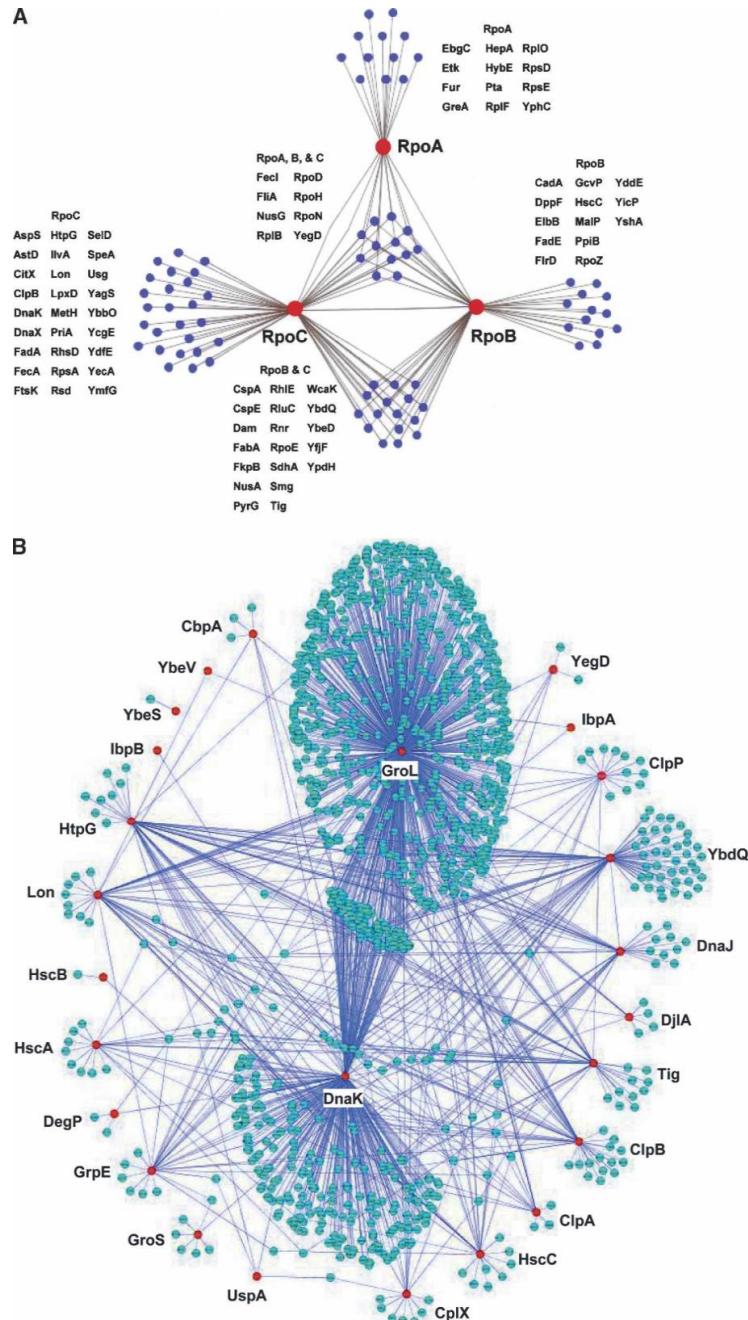


**Slika 11:** Heksamerna struktura proteaze FtsH: (A) pogled z vrha na obroč AAA; ADP in aminokislinski ostanki aktivnega mesta so prikazani kot palčke (siva = ogljiki, modra = dušiki, rdeča = kisiki, modro-zelena = fosforji), ioni  $Zn^{2+}$  pa so prikazani kot zlate krogle. (B) pogled s strani, obroč AAA je na dnu, proteazni obroč pa na vrhu. Raznolikost simetrije proteaze in AAA-obroča naj bi bila odgovorna za transport tarčnega polipeptida v notranjost molekule, kjer so proteolitična mesta (Bieniossek in sod., 2006).

**Figure 11:** Hexameric structure of FtsH protease: (A) Top view approximately down onto the AAA ring. The colors denote the individual subunits. ADP and active site residues are shown as sticks (gray, carbons; blue, nitrogens; red, oxygens; cyan, phosphorous), and the  $Zn^{2+}$  ions are shown as golden spheres. (B) Side view, the AAA ring is on the bottom, the protease ring on the top. The different symmetries of protease and AAA rings suggest a possible translocation mechanism of the target polypeptide chain into the interior of the molecule where the proteolytic sites are located (Bieniossek et al., 2006).

## 2.6 INTERAKCIJE PROTEINOV V ODZIVU NA TEMPERATURNI STRES

Interakcija med proteini je bistvena tako za funkcijo posameznega proteina kot za njegov vpliv na strukturno organiziranost posamezne celice. Med temperaturnim stresom prihaja do interakcij med različnimi proteini, kot so šaperoni, proteaze in RNA-polimeraza (slika 12). Interakcije med glavnimi podenotami RNA-polimeraze ( $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\beta'$ ) in ostalimi proteini imajo pomembno vlogo pri regulaciji odziva, saj omenjene podenote interagirajo s transkripcijskimi modulatorji (npr. CspA), proteini podenot ribosomov (npr. RpsD), pa tudi s šaperoni (npr. DnaK). Prav tako so pomembne interakcije šaperonov z ostalimi proteini, kot sta npr. omrežji šaperonov GroEL in DnaK (slika 12), saj sta oba proteina pomembna v interakcijah, ki vodijo do nastanka pravilnega zvitja proteinov (Arifuzzaman in sod., 2006).



**Slika 12:** Pregled proteinskih interakcij med šaperoni, proteazami in RNA-polimerazo: (A) mreža interakcij proteinov z vsako od podenot RNA-polimeraze. (B) Molekulski šaperoni in njihova mreža interakcij. Rdeča vozlišča so pomembnejši šaperoni, modra vozlišča pa njihove tarče (ostali šaperoni in proteaze) (Arifuzzaman in sod., 2006).

**Figure 12:** Subgraph of protein – protein interactions. (A) RNAP interacting protein network. (B) Molecular chaperones and their target network properties. Red nodes represent major chaperone proteins and blue nodes represent their targets (Arifuzzaman et al., 2006).

## 2.7 INKLUZIJSKA TELESA

Nepravilno zvitje proteinov je lahko posledica spontanih ali induciranih mutacij, ki vplivajo na mehanizme zvijanja proteinov in izpostavljenosti celice zunanjim vplivom, kot so zvišana temperatura, hiperosmoza in preveliko izražanje rekombinantnih genov. Ti nepravilno zviti proteini se nato lahko razgradijo s proteazami, ponovno pravilno zvijejo s pomočjo šaperonov ali tvorijo skupke, ki se izločijo v obliki inkluzijskih teles, ko uidejo kontroli kvalitete proteinskega zvijanja (Miot in Betton, 2004).

Bakterijska inkluzijska telesa so definirana kot dinamične strukture, ki se tvorijo ob porušenem ravnotežju med proteinskim nalaganjem in sproščanjem ter predstavljajo začasne zaloge nepravilno zvitih polipeptidov, ki znotraj celičnega sistema čakajo na procesiranje. Fizikalno-kemijske lastnosti inkluzijskih teles jih opisujejo kot delce nepravilnih oblik ter hidrate, ki so porozni. So predvsem v bakterijski citoplazmi, lahko pa se tvorijo tudi v periplazmi. Proses tvorbe inkluzijskih teles je reverzibilen (Villaverde in Carrio, 2003).

Z industrijskega vidika je tvorba inkluzijskih teles izjemno pomembna, saj s tvorbo le-teh nastajajo netopni proteinski agregati (Ventura in Villaverde, 2006), ki jih je treba nato pretvoriti v pravilno zvite oblike z optimiziranimi postopki renaturacije (Villaverde in Carrio, 2003), kar pa omejuje produkcijo rekombinantnih proteinov (Ventura in Villaverde, 2006). Dolgo je namreč veljalo, da so rekombinantni proteini znotraj inkluzijskih teles vedno biološko neaktivni, kar je tudi resno omejevalo spekter proteinov, ki bi bili sicer izbrani za nadaljnje raziskave z namenom komercializacije (García-Fruitós in sod., 2005).

Pred kratkim je bilo ugotovljeno, da agregacija rekombinantnih proteinov v obliki inkluzijskih teles ne vodi nujno v njihovo inaktivacijo (Jevševar in sod., 2005; ter García-Fruitós in sod., 2005).

V okviru raziskav je bilo namreč potrjeno, da se rekombinantni protein hG-CSF pri 25 °C nalaga v inkluzijskih telesih v obliki pravilno zvitega in biološko aktivnega proteina v približno od 35 % do 40 % celotnega proteina G-CSF (Jevševar in sod., 2005; ter Peternel in sod., 2006). Taka inkluzijska telesa so poimenovali neklašična inkluzijska telesa (nkIT).

Neklašična inkluzijska telesa so definirana kot inkluzijska telesa z velikimi količinami pravilno zvitih proteinov oziroma njihovih prekurzorjev, proizvedena pa so v bakteriji *E. coli* pri suboptimalni temperaturi gojenja (25 °C). Taka inkluzijska telesa imajo drugačne lastnosti kot klasična inkluzijska telesa, saj so v primerjavi s slednjimi definirana z večjo občutljivostjo, večjo topnostjo, ireverzibilnim krčenjem pri kislih pH, in kot smo že omenili, z večjo vsebnostjo pravilno zvitih tarčnih proteinov oziroma njihovih prekurzorjev (Pernel et al., 2006).

## 2.8 ČLOVEŠKI DEJAVNIK SPODBUJANJA NASTANKA KOLONIJ GRANULOCITOV (hG-CSF)

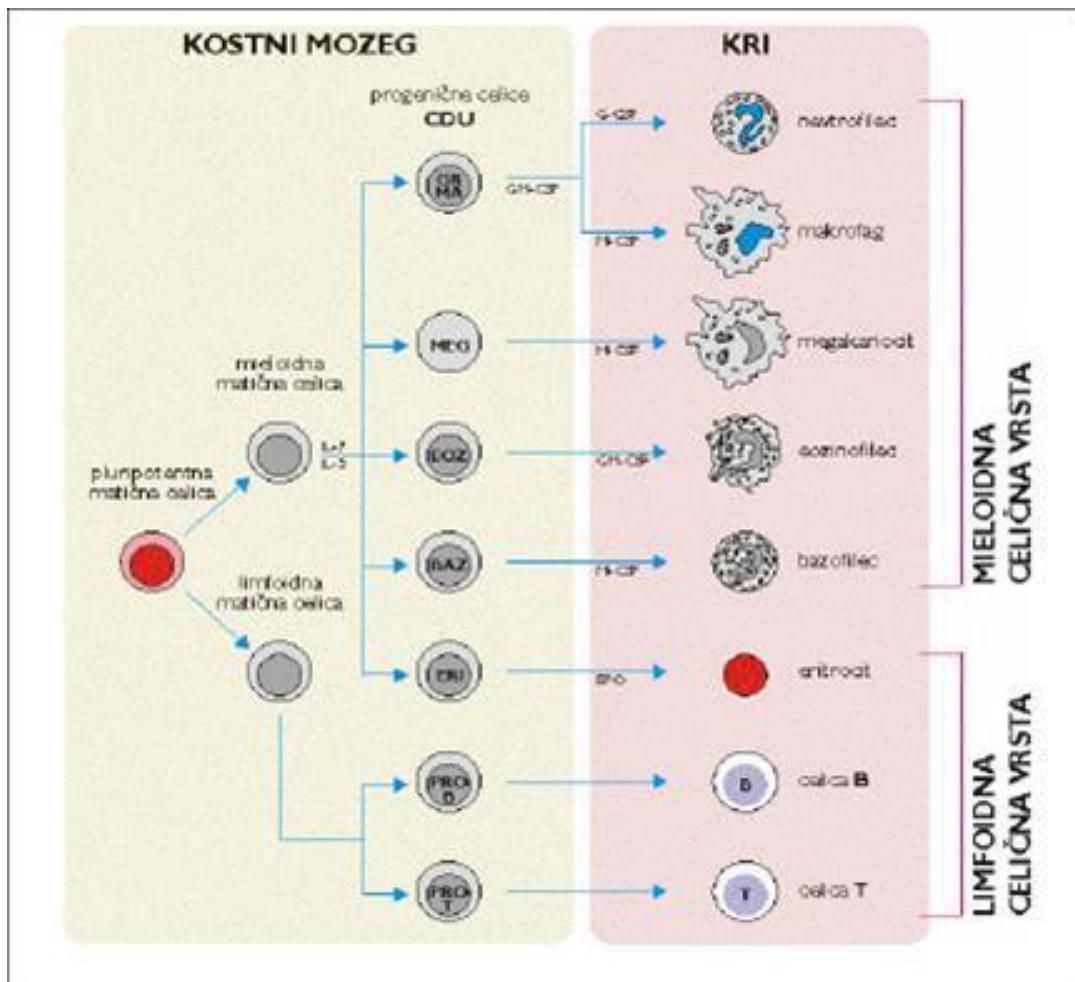
Človeški dejavnik spodbujanja nastanka kolonij granulocitov (hG-CSF) je protein, ki predstavlja centralno na nevtrofilcih osnovano imunsko obrambo, saj ima regulatorno vlogo pri rasti, diferenciaciji, preživetju in aktivaciji nevtrofilcev ter njihovih prekurzorjev (Vanz et al., 2008).

### 2.8.1 Hemopoeza

Vse krvne celice izvirajo iz pluripotentnih matičnih celic (slika 13), ki se vse življenje obnavljajo in so na različnih krajih hemopoeze. Zgodaj v hemopoezi se pluripotentna matična celica diferencira v dve smeri, pri čemer nastane limfoidna matična celica ali mieloidna matična celica.

### 2.8.2 Hemopoetski faktorji

Hemopoetski faktorji so zelo glikozilirane molekule, ki pospešujejo razmnoževanje in diferenciacijo krvnih celic ter spodbujajo končno celično aktivnost. Imenujemo jih faktorji spodbujanja nastanka kolonij oziroma faktor CSF (angl. CSF, *colony stimulating factor*). Faktorji spodbujanja nastanka kolonij so dobili imena po tipu izhodiščne celice, na katero delujejo. V to skupino uvrščamo faktor GM-CSF (angl. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), ki spodbuja v majhnih koncentracijah najprej granulocitne in makrofagne prednike; G-CSF (angl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), ki spodbuja nastanek nevtrofilnih kolonij; M-CSF (angl. *Macrophage Colony Stimulating Factor*), ki spodbudi prednike monocitov (Vozelj, 2000), ter interlevkine (IL) in eritropoetine (Hill et al., 1993).

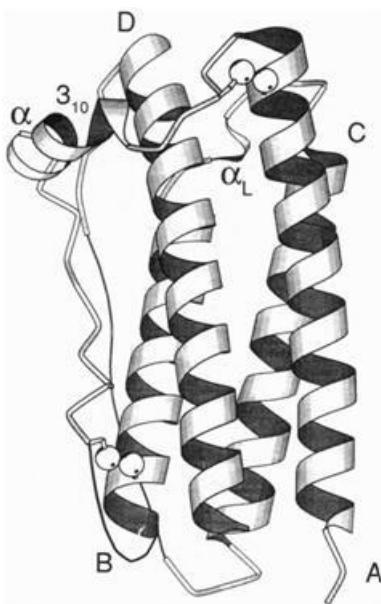


Slika 13: Hemopoeza (nastanek krvnih celic) (Vozelj, 2000)

Figure 13: Hemopoesis (Vozelj, 2000).

### 2.8.3 Človeški dejavnik spodbujanja nastanka kolonij granulocitov (hG-CSF)

Protein hG-CSF je 19,6 kDa velik protein, ki ga sestavlja 174 aminokislinskih ostankov. Je del družine hemopoetskih rastnih faktorjev, večinoma pa ga proizvajajo endotelijalne celice, monociti, makrofagi in fibroblasti. Sestavljen je iz štirih  $\alpha$ -vijačnic (A, B, C, D), ki so med seboj povezane z zankami. Ena zanka povezuje vijačnici A in B, druga pa vijačnici C in D, tretja zanka tvori z vijačnicama B in C lasnici podobno strukturo. Znotraj zanke med  $\alpha$ -vijačnicama A in B je kratka, 4 aminokislinske ostanke velika vijačnica  $3_{10}$  (slika 14).



**Slika 14:** Prikaz strukture molekule rhG-CSF (Hill in sod., 1993)

**Figure 14:** Structure of rhG-CSF (Hill et al., 1993).

Aktivnost rekombinantnega proteina hG-CSF je odvisna od dveh disulfidnih povezav med cisteni  $Cys^{36} - Cys^{42}$  in  $Cys^{64} - Cys^{74}$ , ki sta na nasprotni strani zanke med vijačnico A in B. Disulfidna povezava  $Cys^{36} - Cys^{42}$  je odgovorna za vezavo t. i. Nab-protiteles (angl. *Neutralizing Antibody*), katerih funkcija je izničenje vpliva delovanja antigenov (Hill in sod., 1993).

## 2.9 MIKROMREŽE

Mikromreže so čedalje uporabnejše orodje na področju bioloških, genetskih in medicinskih raziskav. Njihova prednost je v tem, da omogočajo sočasno preučevanje velikega števila genov in podajajo informacije na ravni celotnega genoma preučevanega organizma (Yang in sod., 2004). Dandanes poznamo več tipov tehnologij mikromrež, kot so cDNA-mikromreže, mikromreže s kratkimi oligonukleotidi in mikromreže z dolgimi oligonukleotidi (Baebler, 2006). Rezultat uporabe mikromrež so po navadi številčni in kompleksni podatki, ki predstavljajo analizne izzive (Yang in sod., 2004) ter lahko vodijo do nepravilnih hipotez in sklepov (Dharmadi in Gonzalez, 2004).

### 2.9.1 PRIPRAVA IN HIBRIDIZACIJA MIKROMREŽ

#### Priprava in hibridizacija mikromrež z začetnimi oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide lahko sintetizirajo *in situ* neposredno na površini čipa, ali pa jih prej sintetizirajo in šele nato pritrdijo na čip. Pri *in situ* metodi oligonukleotide sintetizirajo na trdi podlagi z metodo fotolitografije. Pri fotolitografiji uporablja Hg-svetilko, s katero prek fotolitografskega filtra (maske) svetijo na površino čipa. S tem iz naraščajoče verige oligonukletidov selektivno odstranijo za svetlobo občutljive zaščitne skupine. Pri procesu sinteze oligonukleotidov, ki po navadi niso daljši od 25 nukleotidov, lahko uporabljajo nelinearno polprevodno tehnologijo. Pri tem oligonukleotide sintetizirajo *in situ* z robotom, ki na točno določeno mesto mikromreže dostavi ustreznen amid fosforne kisline, ki se uporablja kot sintezni reagent, s čimer sintetizirajo želeno zaporedje (Watson in sod., 1998). Predhodno sintetizirane oligonukleotide nanesemo na čipe enako, kot je opisano za pripravo cDNA-mikromrež. Hibridizacija tarč navadno poteka na čipu v zaprti hibridizacijski komori ali v hibridizacijski aparaturi najpogosteje pri 42 °C (Hybridization and Imaging Protocol, 2010). Po hibridizaciji mikromreže preberemo z laserskimi optičnimi čitalniki.

## 2.9.2 ANALIZA PODATKOV MIKROMREŽ

Da bi dokazali diferencialno izražanje genov, so potrebna različna statistična orodja, s katerimi lahko zelo pravilno povežemo dobljene rezultate z dejanskimi spremembami (Dharmadi in Gonzalez, 2004). Zato je statistična kvantifikacija najprimernejši način znanstvenega pristopa k analizi rezultatov, dobljenih z mikromrežami (Churchill, 2002).

Obdelava podatkov, dobljenih z mikromrežami, se začne takoj po obdelavi surovih podatkov intenzitet posameznih točk na mikromrežah (Dharmadi in Gonzalez, 2004). Sliko, dobljeno z optičnim branjem, najprej analiziramo s programi za obdelavo slike. Na sliko postavimo mrežo, izračunamo povprečno vrednost signalov v posamezni točki na čipu ter izločimo točke slabe kakovosti.

Primarni obdelavi podatkov sledi normalizacija, kjer gre za odstranitev lokalnih in sistemskih napak signalov zaradi neenakomerne vključevanja ali emisije fluorescentnih barvil, in tudi zaradi možnosti napak pri nanosu vzorca. Vrednosti signalov lahko normaliziramo glede na kontrolne točke ali točke z vzdrževalnimi geni (Quackenbush in sod., 2002). Pri uporabi vzdrževalnih genov za normalizacijo predvidevamo, da se v preučevanem organizmu izražanje nekaterih genov ne spremeni kljub spremembam pogojev med analizami. Pri kontrolnih točkah uporabljamo fragmente tuge DNA, katerih signali ostajajo konstantni, ne glede na spremembe pogojev analiz (Dharmadi in Gonzalez, 2004). Za najuporabnejšo metodo se je izkazala globalna normalizacija, kjer so povprečne vrednosti porazdelitev izražanj (ravni izražanja vseh genov na mikromreži) postavljene v osnovi kot enakovredni rezultati. Ta dejstva temeljijo na opažanjih, da je količina transkripta enako porazdeljena med različnimi vzorci, tudi če geni izkazujejo različno izražanje (Yang in sod., 2002).

Normalizaciji podatkov sledi računanje razmerij med preučevanimi vzorci, katerih izražanje primerjamo na mikromreži. Diferencialno izražene gene analiziramo s statističnim t-preizkusom, iz česar izračunamo p-vrednosti (Dharmadi in Gonzalez, 2004), ali/in z iniciativo GO (angl. *Gene Ontology*), ki omogoča določitev bioloških in funkcionalnih značilnosti posameznih genov in njihovih produktov med različnimi organizmi in podatkovnimi zbirkami (Gene Ontology Consortium, 2006; in The Gene Ontology, 2012). Pri tem uporabljamo metodo analize GSEA (angl. *Gene Set Enrichment Analysis*), katere princip delovanja temelji na analizi skupin genov s skupno biološko funkcijo, lokacijo na kromosому ali s skupnim načinom regulacije (Subramanian in sod., 2005).

p-vrednost je prag, na podlagi katerega se lahko zavrne ničelna hipoteza (ničelna hipoteza predstavlja verjetnost, da diferencialno izraženih genov ni, alternativna hipoteza, s katero se

primerja ničelna hipoteza, pa predstavlja verjetnost, da diferencialno izraženi geni so), s čimer postanejo ravni diferencialno izraženih genov statistično značilne. Če primerjamo več pogojev, lahko uporabimo analizo variance (ANOVA) ali analizo nivojev (Kruskal-Wallis) (Dharmadi in Gonzalez, 2004).

Po identifikaciji diferencialno izraženih genov jih je treba ustrezno primerjati. Primerjamo tako njihova razmerja na podlagi metod raziskave razvrščanja v razrede ali napovedi razvrščanja v razrede. Značilnost teh metod je razvrščanje v skupine (angl. *clustering*). Primera takih metod sta tudi metodi analize glavnih komponent (PCA) in večdimenzionalno postavljanje lestvic (MSD), s katerimi zmanjšamo število spremenljivk, hkrati pa dobimo tudi morebitne povezave med spremenljivkami.

Na koncu je še validacija rezultatov, dobljenih z mikromrežami. Pri tem uporabljamo metode, kot sta analiza RNA po Northernu ali qPCR (Dharmadi in Gonzalez, 2004).

## 2.10 TRANSKRIPTOMSKE ANALIZE BAKTERIJE *E. coli*

Pristop transkriptomike je za celovito analizo procesov, pomembnih pri visokogostotni fermentaciji *E. coli* K12, že opisal Yoon s sodelavci (2003), vendar z DNA-čipi, ki komercialno niso dosegljivi. Več poročil tudi navaja razne pristope k optimizaciji produkcije heterolognih proteinov v bakteriji *E. coli* (Jonasson in sod., 2002; ter Baneyx, 1999). Nismo pa zasledili informacij o naboru proteinaz in šaperonov v odvisnosti od temperature gojenja, še posebno v zvezi s pojavom neklašičnih inkluzijskih teles.

Do danes je bilo na področju preučevanja sprememb v bakteriji *E. coli* kot posledic temperturnega stresa (Carruthers in Minion, 2009) ali kombiniranega stresa (vpliv temperturnega stresa in vpliva produkcije rekombinantnih proteinov (Harcum in Haddadin, 2005)) ugotovljeno, da se najpogosteje inducirajo geni, ki nosijo zapise za šaperone (*groEL*, *groES*, *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*), faktorje sigma (*rpoH*, *rpoD*, *htpGX* in *ibpAB*), ter geni, ki nosijo zapis za proteaze (*clpX*, *ftsH*, *hslV* in *hflX*) (Carruthers in Minion, 2009).

Harcum in Haddadin (2005) sta ob temperturnem stresu poročala tudi o vplivu na transkriptomiko metabolnih poti bakterije *E. coli*. Pri tem pride do sprememb v metabolizmu energetskih poti in biosintezi proteinov, oksidativni fosforilaciji (npr. geni, ki nosijo zapis za ATP-sintazo, citokrom, fumarat-reduktazo, NADH-dehidrogenazo ...), biosintezi aminoaciltRNA, glikolizi in Krebsovem ciklu (TCA).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SEVI IN PLAZMIDI

Za preučevanje sprememb v ravni izražanja celotnega nabora molekul mRNA v povezavi z izražanjem zapisa za rekombinantni protein hG-CSF smo izbrali sev BL21 (DE3) bakterije *E. coli* (Novagen) z genotipom DE3: F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) ter ekspresijski plazmid pET3a z insertom [Fopt5]. Gre za produkcijski sev (v predstavljenih rezultatih označen z oznako P). Za kontrolni sev smo uporabili sev, ki je vseboval samo plazmid pET3a brez inserta Fopt5 (v predstavljenih rezultatih označen z oznako C).

Insert Fopt5 je bil pripravljen, kot je opisano v literaturi (Jevševar in sod., 2005), celotna struktura gena, ki kodira protein hG-CSF, pa je opisana v ameriški patentni bazi podatkov.

Produkcijski sev BL21(DE3) je eden najpogosteje uporabljenih produkcijskih sevov, ki jih uporabljam za pridobivanje rekombinantnih proteinov (Jeong in sod., 2009). Vsebuje delecijo gena *ompT*, ki kodira proteazo zunanje membrane, odgovorno za razgradnjo nekaterih rekombinantnih proteinov. Poleg tega vsebuje delecijo gena *lon*, ki kodira glavno proteazo, odgovorno za katalizo endoproteolitske cepitve poškodovanih in rekombinantnih proteinov znotraj celice (Amersham Biosciences, 7. 3. 2010). Produkcijski sev BL21 (DE3) nosi tudi zapis za rekombinantni profag DE3, ki vsebuje gen za RNA-polimerazo T7, ter omogoča visoko izražanje kloniranih genov, ki so pod kontrolo promotorja T7 (Jeong in sod., 2009).

#### 3.2 GOJIŠČA

Za vsa gojišča smo uporabili demineralizirano vodo, ki smo jo proizvedli z napravo Millipore RiOs 16.

- **Gojišče LB:**
  - 10 g fitona (Phytone; Becton Dickinson)
  - 5 g kvasnega ekstrakta (Becton Dickinson)
  - 10 g NaCl (Sigma)

Dopolnimo do 1 l z demineralizirano vodo in avtoklaviramo pri 121 °C 20 minut.  
 Shranimo pri 4 °C.
- **Gojišče LBP:** modificirano gojišče Luria-Bertani, kjer je tripton zamenjan s fitonom

- **Gojišče LBP/amp100:** gojišču LBP tik pred uporabo aseptično dodamo ampicilin (Sigma) do končne koncentracije 100 mg/l.
- **Gojišče LBG/amp10:**  
10 g bacto triptona (Becton Dickinson)  
5 g kvasnega ekstrakta (Becton Dickinson)  
10 g NaCl (Sigma)  
2,5 g glukoze (Sigma)  
Dopolnimo z vodo do 1 l in avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C. Shranjujemo pri 4 °C.  
Tako pripravljenemu ohlajenemu gojišču tik pred uporabo aseptično dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 mg/l.
- **Gojišče LBPG/amp100:** modificirano gojišče Luria-Bertani, kjer je tripton zamenjan s fitonom
- **Gojišče GP2:**  
20 g fitona (Becton Dickinson)  
5 g kvasnega ekstrakta (Becton Dickinson)  
10 g NaCl (Sigma)  
Dopolnimo z vodo do 1 l in avtoklaviramo pri 121 °C. Shranjujemo pri 4 °C.
- **Raztopina elementov v sledovih:**  
FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (40 mg/l)  
CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (40 mg/l)  
MnSO<sub>4</sub>\*nH<sub>2</sub>O (10 mg/l)  
AlCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O (10 mg/l)  
CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (4 mg/l)  
ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (2 mg/l)  
NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O (2 mg/l)  
CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O (1 mg/l)  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,5 mg/l)  
Naštete reagente zatehtamo in raztopimo v 1 l vode ter avtoklaviramo pri 121 °C 20 minut. Shranimo pri 4 °C.
- **Gojišče GYSP:** v 950 ml gojišča GP2 aseptično dodamo 20 ml glukoze koncentracije 500g/l do končne koncentracije 10 g/l, 10 ml raztopine elementov v sledovih ter 18 ml sterilne vode.

- **Gojišče GYSP/amp100:** 1 l gojišča GYSP pred uporabo aseptično dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 mg/l.

### 3.3 RAZTOPINE IN PUFRI

Vse vodne raztopine smo pripravili z vodo Milli-Q, ki smo jo proizvedli z napravo MilliQ RG (Millipore). Vstopna voda je demineralizirana voda iz naprave RiOs 16 (Millipore). Za raztopine, ki smo jih uporabili za izolacijo RNA, smo uporabili vodo, ki ne vsebuje RNaze (angl. *RNase free water*). Priprava večine raztopin je opisana v posameznih poglavjih.

- **0,4 M IPTG (Sigma):**

V 50 ml vode Milli-Q raztopimo 4,766 g IPTG ter sterilno filtriramo skozi 0,22 µm celulozno-nitratnega filtra. V laminariju aseptično razdelimo na manjše volumne (do 10 ml) in shranimo pri –20 °C.

- **Antibiotik ampicilin (50 mg/l):**

V 20 ml vode Milli-Q raztopimo 1 g ampicilina, sterilno filtriramo in razdelimo na manjše volumne med 2 in 10 ml. Shranimo pri –20 °C.

### 3.4 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH SEVOV

Kot referenčni sev bakterije *E. coli*, ki ne proizvaja rekombinantnih proteinov in v katerega je vstavljen plazmid pET3a brez gena za rekombinantni protein hG-CSF, smo vzeli sev BL21 (DE3) (v nadaljevanju sev brez inserta G-CSF oz. kontrolni sev – oznaka C). Za pridobivanje proteina hG-CSF pa smo uporabili ekspresijski plazmid pET3a, v katerega je vstavljen optimiran gen za hG-CSF, poimenovan Fopt5 (v nadaljevanju sev z G-CSF insertom oz. produkcijski sev – oznaka P). Plazmid pET3a-Fopt5 je bil vstavljen v sev BL21(DE3) bakterije *E. coli* (Jevšev var in sod., 2005).

#### 3.4.1 Priprava inokuluma za kontrolni in produkcijski sev

Odmrznjeno kulturo iz delovne banke sevov (shranjeno pri –70 °C) smo precepili v 50-ml erlenmajerico s 5–10 ml gojišča LBPG/amp100 v razmerju 1 : 500. To kulturo smo nato stresali na stresalniku pri 25 °C in 160 vrtljajih na minuto čez noč (12–18 ur) do optične gostote  $OD_{600} \approx 4,0$ .

### **3.4.2 Gojenje bakterijskih kultur**

Ko je bila dosežena  $OD_{600} \approx 4,0$ , smo zraslo kulturo (inokulum) vcepili v produkcijsko gojišče GYSP/amp10 ter nemudoma inducirali z dodatkom 0,4 mM IPTG. Pri tem smo si za vsako temperaturo gojenja pripravili 6 vzorcev; tj. 3 ponovitve za vzorce brez inserta G-CSF (kontrolni sev) in 3 ponovitve za vzorce z insertom G-CSF (produkcijski sev). Oba seva smo gojili v treh ponovitvah pri temperaturi 25 °C, 37 °C in 42 °C, skupaj 18 vzorcev.

Tako pripravljene kulture smo inkubirali v stresalniku v erlenmajericah pri 160 vrtljajih na minuto, vse dokler stresane kulture niso dosegle svoje optimalne optične gostote; tj. na prehodu iz logaritemske v stacionarno fazo (Jevševar, 2007, Škulj in sod., 2008). Na prehodu logaritemske faze v stacionarno so bile dosežene različne optične gostote kultur pri različnih temperaturah gojenja, najverjetneje v odvisnosti od hitrosti rasti pri posamezni temperaturi gojenja. Najvišjo optično gostoto so dosegle kulture, stresane pri 25 °C (z insertom G-CSF ali brez njega), in sicer okoli  $OD_{600} \approx 10$ , medtem ko je bila ta vrednost za kulture, gojene pri 37 °C in 42 °C (z insertom G-CSF ali brez njega) le okoli  $OD_{600} \approx 4$ , kar smo določili z neposrednim spremeljanjem rastnih krivulj pri posameznih temperaturah gojenja (glejte poglavje Rezultati). Ko smo dosegli opisane optične gostote posameznih vzorcev, gojenih pri različnih temperaturah, smo ustrezen volumen fermentacijske brozge prenesli v centrifugirke in 5 minut centrifugirali pri 5500 g, previdno odstranili supernatant, dodali dvokratno količino zaščitnega bakterijskega reagenta za RNA (angl. *RNA protect Bacteria Reagent*; Qiagen) ter 5 minut centrifugirali pri 3200 g. Supernatant smo nato odstranili, bakterijsko usedlino pa shranili pri –80 °C za nadaljnjo uporabo.

### **3.4.3 Izdelava rastnih krivulj bakterijskih sevov**

Kulture smo gojili, kot je opisano v poglavju 3.5.1.2. Pri tem smo v časovnih razmikih iz kultur jemali vzorce in jim merili optično gostoto. Na podlagi dobljenih podatkov smo narisali rastne krivulje, in sicer za sev bakterije *E. coli* BL21(DE3) s plazmidom brez inserta G-CSF in s plazmidom z insertom G-CSF pri treh različnih temperaturah gojenja (25 °C, 37 °C in 42 °C).

## **3.5 IZOLACIJA celotne RNA, RAZGRADNJA Z DNazo ter ČIŠČENJE in KONCENTRIRANJE RNA**

Za izolacijo celotne RNA (totRNA) smo uporabili usedlino bakterij, ki smo jo prej shranili pri –80 °C. Pri tem smo uporabili modificiran postopek za pripravo RNA, ki so ga opisali Petek in sodelavci (2010) ter vključuje encimsko lizo (Kornblumu in sod., 1988), izolacijo totRNA s

kompletom RNeasy Mini (Qiagen), odstranjevanje genomske DNA z DNazo in čiščenje RNA s kompletom RNeasy MinElute (Qiagen).

### **3.5.1 Postopek izolacije totRNA**

- a) Usedlina bakterij (5 ml) (ali manj).
- b) Dodaj 180 µl liznega pufra SET (20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM EDTA; saharoza (200 g/l) (pH 7)) z 20 µl lizocima (10 mg; 500 mg/ml, raztopljen samo v TE).
- c) Inkubiraj na ledu 20 minut (po 10 minutah mešati na vibracijskem mešalniku).
- č) Inkubiraj pri 37 °C 3 minute.
- d) Dodaj 200 µl 2 % NaDS in 5 µl proteinaze K (20 mg/ml).
- e) Inkubiraj pri sobni temperaturi 15 minut.
- f) Dodaj 800 µl pufra RLT.
- g) Močno mešaj na vibracijskem mešalniku.
- h) Obdelaj z ultrazvokom pri 56 °C 5 minut.
- i) Centrifugiraj 5 minut pri 10.000 g (če je pregosto in ni usedline, ni potrebno).
- j) Supernatant prenesi v 2-ml mikrocentrifugirko s 600 µl absolutnega etanola in premešaj s pipetiranjem (če ni usedline, ni treba prenesti v novo mikrocentrifugirko).
- k) Lizat nanesi na kolono RNeasy Mini Spin (po 700 µl).
- l) Centrifugiraj 30 sekund pri 14.000 g (ponovi točki k in l, dokler ne porabiš vsega vzorca).
- m) Na kolono nanesi 700 µl pufra RW1 in centrifugiraj 30 sekund pri 14.000 g.
- n) Ponovi spiranje s pufrom RW1.

- o) Prenesi kolono na novo mikrocentrifugirko in dodaj 500 µl pufra RPE.
  - p) Centrifugiraj 30 sekund pri 14.000 g in zavrzi eluirano raztopino (koraka o in p ponovi dvakrat).
  - r) Kolono prenesi na novo mikrocentrifugirko in centrifugiraj 2 minuti pri 14.000 g.
  - s) Kolono prenesi na novo mikrocentrifugirko in na membrano kolone dodaj 40 µl ogrete (65 °C) vode.
  - š) Inkubiraj 10 minut pri sobni temperaturi.
  - t) Centrifugiraj 2 minuti pri 14.000 g.
- ↓
- 35–40 µl totRNA

Po zadnji izolacijski stopnji smo kvantiteto in kvaliteto izolirane RNA preverili spektrofotometrično s spektrofotometrom NanoDrop (NanoDrop Technologies) tako, da smo najprej umerili aparat z 1,5 µl vode brez RNaze, določili ozadje (slepa) ter določili koncentracije in razmerje absorbanc (A260/280) posameznih vzorcev pri različnih temperaturah.

### **3.5.2 Določanje kakovosti in koncentracije izolirane RNA z agarozno gelsko elektroforezo**

Po končani izolaciji smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili kakovost totRNA glede na standard, in sicer tako, da smo jo izvedli na 1%-agaroznem gelu v pufru TBE. Raztopini agaroze smo dodali tudi etidijev bromid (10 mg/ml) (1,5 µl). Lise RNA smo preverili na osnovi fluorescence etidijevega bromida pod UV-svetlobo na transiluminatorju. Elektroforezno kad smo napolnili s pufrom TBE, vstavili gel in priključili na vir napetosti 100 V za približno 30 minut, tako da smo dobili želeno ločitev fragmentov RNA. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali pod UV-svetlobo.

### 3.5.3 Razgradnja z DNazo

V nadaljevanju smo vzorce tot RNA obdelali z DNazo I (Deoxyribonuclease I, amplification grade, Invitrogen) z namenom odstranitve morebitnih ostankov genomske DNA. Pripravili smo 20 µl reakcijske mešanice:

- 5 µg totRNA (preračunano približno 3–5 µl)
- 0,2 U DNaze (0,2 µl)
- 2 µl 10x pufra

Razredčili smo do 20 µl z vodo brez RNaze, inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi in z dodatkom 2 mM raztopine EDTA (približno 2 µl (25 mM (pH 8)) ustavili reakcijo. Nato smo inkubirali 10 minut pri 65 °C (inaktivacija DNaze).

Kakovost RNA smo ponovno preverili z agarozno gelsko elektroforezo tako, da smo v vsak žepek gela nanesli reakcijsko mešanico 1 µl RNA, 6 µl nanašalnega pufra in 6 µl vode brez RNaze. Za odstranitev preostalih encimov in pufrov smo uporabili komplet reagentov za čiščenje RNA (opisano pod točko 3.5.4).

### 3.5.4 Čiščenje in koncentriranje RNA

Z namenom odstranitve preostalih prisotnih encimov in pufrov smo dobljeno tot RNA, ki je bila obdelana z DNazo, očistili s kompletem reagentov za čiščenje RNA (angl. *RNA purification kit*) (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Postopek čiščenja in koncentriranja RNA

- 1) Vzorcu dodaj vodo brez RNaze do 100 µl, dodaj 350 µl pufra RLT ter mešaj na vibracijskem mešalniku. Nato dodaj 250 µl absolutnega alkohola (od 96- do 100-%) in dobro premešaj s pipeto. Takoj nadaljuj z naslednjim korakom.
- 2) S pipeto prenesi celoten vzorec na kolono RNeasy MinElute Spin, ki je postavljena na 2-ml mikrocentrifugirki ter centrifugiraj 30 sekund pri 18.000 g.
- 3) Prenesi kolono na novo mikrocentrifugirko ter dodaj 500 µl pufra RPE. Centrifugiraj 30 sekund pri maksimalnih vrtljajih in eluat zavrzi.
- 4) Na kolono dodaj 500 µl 80-% etanola. Previdno zapri pokrov kolone ter centrifugiraj 2 minuti pri 18.000 g. Zavrzi eluat skupaj z zbirno mikrocentrifugirko.

- 5) Kolono prenesi na novo 1,5-ml mikrocentrifugirko, odreži pokrov kolone (shrani za naslednje korake) ter centrifugiraj 5 minut pri maksimalnih vrtljajih. Zavrzi eluat skupaj z mikrocentrifugirko.
- 6) Prenesi kolono na novo 1,5-ml mikrocentrifugirko in na sredino membrane kolone previdno dodaj 20 µl predhodno segrete vode brez RNaze (80 °C).
- 7) Vzorec inkubiraj 10 minut pri sobni temperaturi ter centrifugiraj 2 minuti pri maksimalnih vrtljajih.

Po zadnji stopnji smo kvantiteto in kvaliteto izolirane RNA najprej preverili spektrofotometrično z aparatom NanoDrop (NanoDrop Technologies) ter nato še z agarozno gelsko elektroforezo.

### 3.6 SINTEZA cDNA

#### 3.6.1 Sinteza prve verige cDNA

Z visokozmogljivim kompletom reagentov za cDNA-transkripcijo (Superscript II, Invitrogen) smo predhodno očiščeno RNA uporabili za sintezo cDNA in neposredno označevanje.

Na začetku smo vsakemu vzorcu RNA dodali kontrolno luciferazno mRNA v koncentraciji 1 ng/µl (Promega) ter 3 µg naključnih začetnih oligonukleotidov (Invitrogen), in sicer smo 30 µg RNA (v maksimalnem volumnu 13,2 µl) dodali še:

- 1,7 µl naključnih začetnih oligonukleotidov
- 1 µl luciferaze (1 mg/ml)
- vodo brez RNaze do 15,9 µl

Temu je sledila 10-minutna inkubacija pri 70 °C, nato pa takojšnje ohlajanje na ledu. Tako pripravljenim vzorcem smo dodali osnovno zmes (angl. *master mix*), ki je vsebovala (preglednica 7):

**Preglednica 7:** Priprava osnovne reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo na eno reakcijo oziroma vzorec

**Table 7:** Preparation of reverse transcription master mix.

Reagent	V ( $\mu\text{l}$ )
5 volumskih enot pufra za sintezo prve verige	6
10X DTT (100 mM)	3
mešanica dNTP (25 mM dATP/GTP/TTP in 10 mM dCTP)	0,6
reverzna transkriptaza SuperScript II (200 U/ $\mu\text{l}$ )	2
skupni volumen ( $\mu\text{l}$ )	11,6

Tej reakcijski mešanici smo nato dodali še 2,5  $\mu\text{l}$  barvila Cy5, vezanega na dCTP, (v temi) ter vse vzorce inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, čemur je sledila 110-minutna inkubacija pri 42 °C.

### 3.6.2 Zaustavitev sinteze cDNA

Po inkubaciji pri 42 °C smo za zaustavitev sinteze cDNA prej opisani reakcijski zmesi dodali najprej 10  $\mu\text{l}$  1-M NaOH, inkubirali 10 minut pri 70 °C ter nevtralizirali reakcijo z dodatkom 10  $\mu\text{l}$  1-M HCl.

### 3.6.3 Čiščenje označene cDNA

Po nevtralizaciji smo pripravljeno cDNA očistili s kompletom MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

Postopek čiščenja označene cDNA

- Vzorcu dodaj 5 volumskih enot pufra PB (približno 250  $\mu\text{l}$ ).
- Nanesi na kolono in centrifugiraj 1 minuto pri 13.000 g.
- Zavrzi eluat in na kolono dodaj 750  $\mu\text{l}$  pufra PE ter centrifugiraj 1 minuto pri 13.000 g.
- Zavrzi eluat in na kolono dodaj 500  $\mu\text{l}$  pufra PE ter centrifugiraj 1 minuto pri 13.000 g.

- e) Eluat prenesi na novo mikrocentrifugirko in centrifugiraj 2 minuti pri maksimalnih vrtljajih (odprta mikrocentrifugirka).
- f) Prenesi kolono na novo 1,5-ml mikrocentrifugirko ter dodaj 12 µl vode brez RNaze (ogrete na 65 °C) neposredno na membrano kolone.
- g) Inkubiraj 10 minut pri sobni temperaturi, centrifugiraj 1 minuto pri 13.000 g.

Ponovno dodaj 12 µl vode brez RNaze (ogrete na 65 °C) ter še enkrat ponovi korak g.

### **3.6.4 Določanje koncentracije cDNA in vgrajenih barvil**

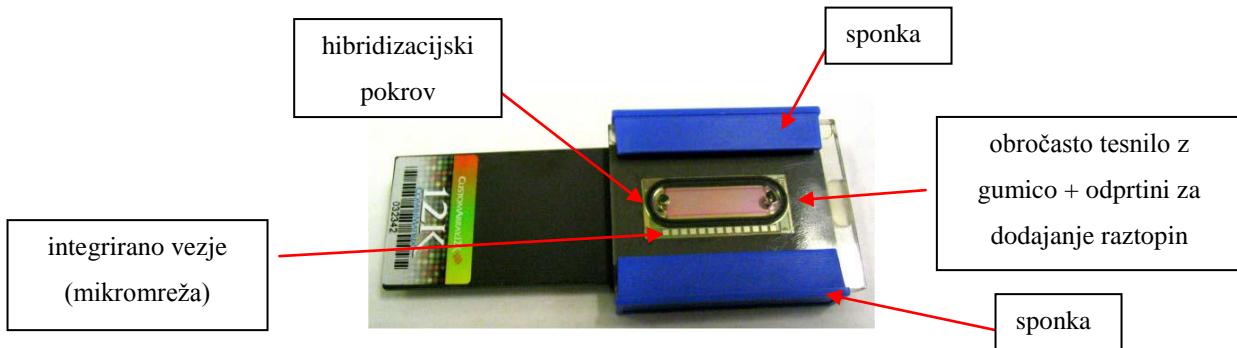
Koncentracijo cDNA in vgrajenega barvila smo najprej preverili s spektrofotometrom NanoDrop (NanoDrop Technologies), kot je že opisano pod točko 3.6.1, le da smo izbrali merjenje razmerij A260/280 ssDNA, ter nato še z agarozno gelsko elektroforezo.

## **3.7 HIBRIDIZACIJA MIKROMREŽ**

### **3.7.1 Priprava mikromrež**

Vse uporabljene mikromreže so bile že predhodno pripravljene v podjetju CombiMatrix Corporation (ZDA) s tehnologijo, ki vsebuje modificiran polprevodnik, prirejen za biološke aplikacije (slika 15). Znotraj te aplikacije so integrirana vezja, ki vsebujejo mreže mikroelektrod in delujejo samostojno z vgrajenim logičnim vezjem na čipu. Čip, ki je v posebno oblikovani tekočinski komori, se odziva na ukaze računalnika, tako da digitalno usmerja sestavljanje biopolimerov (polinukleotidov) v verigo. V tem kontroliranem okolju vsaka mikroelektroda (vsaka od elektrod ima premer 94 µm) z elektrokemijsko reakcijo selektivno ustvari kemijske reagente. Ti kemijski reagenti omogočajo *in situ* sintezo molekul, kot so npr. DNA-oligonukleotidi (CombiMatrix – DNA Microarrays, 2010). Mikromreže, ki smo jih uporabili pri raziskavi (CustomArray™ 12K Microarray, 2010), so vsebovale 12.000 oligonukleotidov, ki predstavljajo celoten genom bakterije *E. coli* (vsak od približno 4200 genov je prisoten v treh ponovitvah), ta pa vsebuje vse gene ter zaporedja pozitivnih (tudi luciferazno cDNA) in negativnih kontrol (Performance of 12000..., 2010).

Uporabljena mikromreža z ohišjem je predstavljena na sliki 15.



**Slika 15:** Mikromreža CustomArray™ 12K s potrebnimi sestavnimi deli (CustomArray™ 12K Microarray, 2010)

**Figure 15:** Assembled CustomArray™ 12K microarray (CustomArray™ 12K Microarray, 2010).

### 3.7.2 Hibridizacija mikromrež

Vse mikromreže proizvajalca Combimatrix smo hibridizirali z 18 predhodno pripravljenimi vzorci, ki so predstavljeni v preglednici 8 (oznake vzorcev so razložene v preglednici 18 v poglavju 4.2).

**Preglednica 8:** Prikaz oznak vzorcev za hibridizacije

**Table 8:** Samples for hybridization.

Temperatura	<i>E. coli</i> BL21(DE3) – pET3a			<i>E. coli</i> BL21(DE3) – pET3a - [Fopt5]		
25 °C	25 <sub>C1</sub>	25 <sub>C2</sub>	25 <sub>C3</sub>	25 <sub>P1</sub>	25 <sub>P2</sub>	*25 <sub>P3</sub>
37 °C	37 <sub>C1</sub>	37 <sub>C2</sub>	37 <sub>C3</sub>	37 <sub>P1</sub>	37 <sub>P2</sub>	37 <sub>P3</sub>
42 °C	42 <sub>C1</sub>	42 <sub>C2</sub>	42 <sub>C3</sub>	42 <sub>P1</sub>	42 <sub>P2</sub>	42 <sub>P3</sub>

\*Med izolacijo je prišlo do tehnične napake, zaradi česar tega vzorca nismo uporabili v nadaljevanju.

Za posamezno temperaturo gojenja smo pripravili 6 vzorcev bakterijske cDNA; tj. za vsako posamezno temperaturo (25 °C, 37 °C in 42 °C) po 3 vzorce produksijskega seva, ki vsebuje zapis za protein G-CSF (*E. coli* BL21(DE3) – pET3a - [Fopt5]), in 3 vzorce kontrolnega seva, ki omenjenega zapisa ne vsebuje (*E. coli* BL21(DE3) – pET3a). Vsako mikromrežo smo

najprej pripravili po navodilih podjetja CombiMatrix (dodatek hibridizacijskega pokrova in sponk, slika 15).

Za hibridizacije smo mikromreže pripravili tako, da smo jih najprej sprali z vodo brez RNaze in inkubirali 10 minut pri 65 °C. Temu je sledila takojšnja ohladitev na sobno temperaturo. Pred hibridizacijo smo izvedli tudi predhibridizacijo, in sicer z uporabo 2X formamidnega hibridizacijskega pufera (Genisphere) in dodatkom DNA iz lososovih testisov (Salmon testis DNA, 1 µg/µl, Sigma, ZDA) (preglednica 9).

Predhibridizacijsko raztopino smo nato odstranili z mikromreže in dodali hibridizacijske raztopine, ki so vsebovale tarčne cDNA.

Preden smo na mikromreže dodali hibridizacijsko mešanico (preglednica 10), smo jo greli 3 minute pri 95 °C, takoj ohladili na ledu in ponovno pogreli za nadaljnjo uporabo. Nato smo predhibridizacijsko raztopino nanesli na mikromreže, zlepili odprtine za dodajanje raztopin s PCR-folijo in ob vrtenju inkubirali 30 minut pri 42 °C.

**Preglednica 9:** Priprava predhibridizacijske raztopine

**Table 9:** Preparation of the pre-hybridization solution.

Reagent	V (µl)
hibridizacijski pufer (2X pufer na osnovi formamida) (sestava: 20X SSPE, 10 % Tween-20, 0,5 M EDTA, voda brez nukleaz)	55
DNA lososa (100 ng/µl)	1,1
voda brez RNaze	53,9
skupaj	110

**Preglednica 10:** Priprava hibridizacijske raztopine (\*glede na dejanski volumen cDNA smo dodali vodo brez RNaze do razlike)

**Table 10:** Preparation of hybridization solution (\*we adjusted addition of RNase free water according to the actual volume of cDNA).

Reagent	V (µl)
hibridizacijski pufer (2X pufer na osnovi formamida)	55
DNA lososa (100 ng/µl)	1,1
kontrolaCy5 (50-krat redčena raztopina)	1
cDNA*	
voda brez RNaze*	52,9
skupaj	110

Hibridizacija je potekala eno uro ob vrtenju mikromrež pri 42 °C v inkubatorju. Nato smo mikromreže spirali po protokolu podjetja Combimatrix (Combimatrix's Protocol for Hybridizations and Imaging, CustomArray™ 12K Microarray, 2010), kot sledi:

- Najprej smo posamezni mikromreži dodali predhodno na 42 °C segreto raztopino za spiranje 6X SSPE (sestava: 3 M NaCl, 0,2-M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, in 0,02 M EDTA) z dodatkom 0,05 % Tween-20 (sledilo je rotiranje v inkubatorju 5 minut pri 42 °C).
- Nato smo dodali raztopino za spiranje 3X SSPE z dodatkom 0,05 % Tween-20 (najprej spiranje in nato še inkubacija pri sobni temperaturi eno minuto).
- Sledil je dodatek raztopine za spiranje 0,5X SSPE z dodanim 0,05 % Tween-20 (najprej spiranje in nato še inkubacija pri sobni temperaturi eno minuto).
- Sledil je dodatek raztopine za spiranje 2X PBS (sestava (w/v): NaCl (8 %), KCl (0,2 %), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,15 %) in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 %)) z dodanim 0,01 % Tween-20 (najprej spiranje in nato še inkubacija pri sobni temperaturi eno minuto).
- Nato smo dodali raztopino za spiranje 2X PBS (najprej spiranje in nato še inkubacija pri sobni temperaturi eno minuto).
- Zadnji korak smo ponovili še enkrat.

Po končanem spiranju smo vsem mikromrežam dodali raztopino za spiranje 2X PBS in jih obdržali namočene v omenjeni raztopini, vse dokler niso bile uporabljene pri optičnem branju.

Pred vsakim spiranjem (velja za vsak korak prej opisanega spiranja) smo odstranili prejšnjo dodano raztopino za spiranje ter dodali novo. Prav tako smo pri vsakem spiranju uporabljali lepilni trak, s katerim smo preprečili uhajanje raztopine skozi odprtini za dodajanje raztopin.

### 3.8 ANALIZA SLIKE IN OBDELAVA PODATKOV MIKROMREŽ

Signal fluorescentnega barvila Cy5 na mikromrežah smo optično brali s fluorescentnim optičnim čitalnikom (LS200 scanner, TECAN). Pred optičnim branjem smo vse mikromreže pripravili, kot je predpisano v protokolu podjetja CombiMatrix (Protocol for Hybridizations and Imaging (CustomArray™ 12K Microarray, 2010), in sicer tako, da smo najprej odstranili sponke, hibridizacijski pokrov in raztopino za spiranje 2X PBS. Posamezni mikromreži smo nato dodali raztopino za slikovno obdelavo (Imaging solution) ter jo pokrili s krovnim stekelcem (LifterSlip™). S tem je bila mikromreža pripravljena za optično branje. Mikromreže smo nato vstavili v optični čitalnik in optično brali po predhodnih nastavitevah. Nato smo čez slike prebranih mikromrež s programom za branje mikromrež podjetja CombiMatrix (angl. CombiMatrix Microarray Imager) nastavili mrežo, ki nam je omogočila, da smo ustrezno ovrednotili signal posameznih točk (odstranitev pack ...).

Dobljene rezultate smo s programsko opremo podjetja CombiMatrix (Microarray Images Software, 2010) izvozili v obliki datotek TXT in jih prekopirali v datoteke Excel za nadaljnjo obdelavo. Po kontroli rezultatov v Excelu smo vse podatke signalov za posamezne mikromreže, skupaj z datoteko GAL (angl. GenePix Array List, vsebuje podatke o lokaciji posameznih točk), pripravili za nadaljnjo obdelavo s programsko opremo R (<http://www.r-project.org/>, 2010). Statistično vrednotenje smo izvedli s programsko opremo R in paketi affy, limma in KEGGsoap. Pri delu smo si pomagali tudi z informacijami o tovarniško vgrajenih kontrolah (<http://www.combimatrix.com>, 9. feb. 2010), s čimer smo uspeli potrditi ustreznost izbrane metode statističnega vrednotenja. Vsi podatki so bili pripravljeni v obliki identifikacijskih oznak genov (angl. GeneID tags), kar nam je olajšalo iskanje po različnih podatkovnih zbirkah, namenjenih analizam bioloških poti. Dve od uporabljenih podatkovnih zbirk sta bili KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>, 9. feb. 2010) in EcoCyc (Encyclopedia of *Escherichia coli* K-12 Genes and Metabolism, <http://www.ecocyc.org/>, 9. feb. 2010).

Pri obdelavi podatkov smo ugotovili razlike v merjenih intenzitetah fluorescenc posameznih mikromrež. Pri tem smo opazili, da zgornji (glede na navpično orientacijo; razvidno iz slike 18) del mikromrež ne kaže enake odzivnosti kot spodnji del mikromrež. Na podlagi

ugotovljenega in dejstva, da ima posamezna mikromreža po celotni površini enakomerno razporejene gene (več kot 4200 genov) v treh ponovitvah, smo se odločili, da za nadaljnjo statistično vrednotenje uporabimo samo spodnji del (približno spodnjo tretjino) mikromrež, saj je bila na tem predelu mikromrež fluorescentna intenziteta enaka. S tem nismo znatno zmanjšali števila analiziranih genov.

V naslednjem koraku smo podatke normalizirali (kvantilna normalizacija) in izvedli statistično vrednotenje tako, da smo primerjali rezultate izražanja posameznih genov v povezavi z različnimi temperaturami. Z drugimi besedami, spremembo v ravni izražanja posameznega gena pri temperaturah 37 °C in 42 °C smo primerjali z istim genom pri temperaturi 25 °C tako v primeru, ko je plazmid za izražanje vseboval zaporedje za prepis tarčnega proteina hG-CSF (produkcijski sev), kot v primeru, ko plazmid za izražanje ni vseboval zaporedja za prepis tarčnega proteina hG-CSF (kontrolni sev). Rezultate smo izrazili kot  $\log_2$  (logFC) vrednosti razmerij med posameznimi izražanji vzorčnih skupin (npr. primerjava med temperaturama 42 °C in 25 °C z insertom G-CSF). Te rezultate smo pripravili v obliki identifikacijskih oznak GeneID, kar nam je omogočilo neposreden dostop do informacij na spletni strani podatkovne zbirke EcoCyc (<http://www.ecocyc.org/expression.html>, 20. maj 2010). Za pregled bioloških poti posameznih genov bakterije *E. coli* v podatkovni zbirki EcoCyc smo uporabili samo rezultate, ki so imeli vrednosti stopnje verjetnosti večje od 95 % ( $p < 0,05$ , t-preizkus). Dodatno, z namenom izključitve lažno pozitivnih rezultatov, nismo tudi upoštevali rezultatov, ki so imeli  $\log_2$  vrednosti razmerij genskega izražanja med -0,5 in 0,5, čeprav so na podlagi t-preizkusa veljali za pomembne (M. Pompe-Novak in sod., 2006). Prav tako smo dobljene vrednosti analizirali z bioinformacijsko iniciativo GO (Gene Ontology), ki omogoča določitev bioloških in funkcionalnih značilnosti posameznih genov in njihovih produktov med različnimi organizmi in podatkovnimi zbirkami (Gene Ontology Consortium, 2006; in The Gene Ontology, 2012). Pri tem smo uporabili metodo analize GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), katere princip delovanja temelji na analizi skupin genov s skupno biološko funkcijo, lokacijo na kromosому ali način regulacije (Subramanian in sod., 2005).

### 3.9 ANALIZA IN VIZUALIZACIJA PODATKOV S PODATKOVNO ZBIRKO ECOCYC

V nadaljevanju smo za različno izražene gene vse normalizirane podatke preverili s podatkovno zbirko EcoCyc, tako da smo v podatkovno zbirko EcoCyc vstavili predhodno pripravljene datoteke. Rezultate smo vizualizirali z aplikacijo Pathway Tools Omics Viewer (<http://biocyc.org/ECOLI/expression.html>, 21. maj 2010). Dobljene rezultate smo nato predstavili v obliki pregleda sprememb na ravni metabolnih poti bakterije *E. coli* (vpogled v potek metabolnih poti, razred preučevanega metabolita in njegovih reakcij).

### 3.10 PCR V REALNEM ČASU

Iz podatkov, pridobljenih po kvantilni normalizaciji, in iz baz podatkov EcoCyc, KEGG in UniProt smo izbrali šest genov (*yeaZ*, *ydcP*, *groEL*, *ecpD*, *torD* in *uspD(yiiT)*), katerih rezultate smo preverili z analizo qPCR, ki temelji na tehnologiji TaqMan® (T. Nolan in sod., 2006). Gene smo izbrali glede na rezultate hibridizacij tako, da smo poskušali zajeti čim bolj raznolike spremembe v ravni izražanja (npr. produkcijski sev bakterije *E. coli* BL21) pri različnih temperaturah. Pri tem smo upoštevali funkcije delovanja posameznih proteinov, ki jih omenjeni geni kodirajo (preglednica 11).

**Preglednica 11:** Funkcije delovanja posameznih izbranih genov (podatkovne zbirke EcoCyc, KEGG in UniProt, 21. maj 2010)

**Table 11:** Functions of tested genes (EcoCyc, KEGG and UniProt databases, 21.5.2010).

Izbrani gen	Funkcija delovanja
<i>yeaZ</i>	proteaza, katere funkcija ni dobro raziskana
<i>ydcP</i>	proteaza, katere funkcija še ni dobro raziskana
<i>groEL</i>	šaperon, pomemben za pravilno zvijanje proteinov, ki je del kompleksa GroEL-GroES
<i>ecpD</i>	šaperon, ki sodeluje pri tvorbi celične stene ter pri nastanku pilov
<i>torD</i>	šaperon, ki sodeluje pri zvijanju proteinov
<i>uspD</i>	univerzalni stresni protein

Za referenčni gen (interni kontrola) smo uporabili rRNA 16S. Posamezen vzorec RNA, ki je bil izoliran, kot je opisano v poglavju 3.5, smo v nadaljevanju obdelali z dodatkom 0,2 U DNaze I (Invitrogen) tako, da smo pridobili približno 3 µg z DNazo obdelane RNA, ki smo jo prepisali z visokozmogljivostnim kompletom (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems).

#### 3.10.1 Obratno prepisovanje

Obratno prepisovanje smo izvedli s kompletom reagentov (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). Sledili smo protokolu proizvajalca (High Capacity cDNA, 2010), pri čemer smo si najprej pripravili osnovno reakcijsko mešanico (preglednica 12). Nato smo 1 µg z DNazo obdelane RNA raztopili v 12,5 µl vode brez RNaze, denaturirali pri 80 °C 5 minut in jo nemudoma ohladili na ledu. Temu smo dodali osnovno reakcijsko mešanico.

**Preglednica 12:** Priprava osnovne reakcijske mešanice

**Table 12:** Preparation of the master mix

Reagent	V(µl)
10X pufer RT	2,5
25X dNTP mešanica (100 mM)	1
10X naključni začetni oligonukleotidi	2,5
reverzna transkriptaza (200 U/µl)	1,25
RNazni inhibitor (RNAsin 10 U/ µl)	1
voda brez RNaze	4,25
skupaj	12,5

Nato smo izvedli obratno prepisovanje v aparaturi PCR pri 25 °C 10 minut in pri 37 °C 120 minut.

### 3.10.2 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Nukleotidna zaporedja izbranih genov smo pridobili iz javno dostopne podatkovne zbirke iskalnega orodja NCBI BLAST (angl. National Center for Biotechnology Information) s programom tblastn ali tblastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 15. feb. 2010), tako da smo iz podatkovne zbirke EcoCyc vzeli proteinsko zaporedje posameznega preučevanega gena in ga prenesli v iskalno orodje NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 15. feb. 2010). S tem smo dobili želena nukleotidna zaporedja posameznih genov ter jih uporabili za pripravo začetnih oligonukleotidov.

#### 3.10.2.1 Sonde in začetni oligonukleotidi

Nukleotidna zaporedja smo pripravili s programom File Builder v3.1 (Applied Biosystems) in jih posredovali podjetju Applied Biosystems, kjer so na podlagi zaporedij pripravili začetne oligonukleotide. V preglednici 13 so prikazani začetni oligonukleotidi in sonde, ki smo jih uporabili za reakcijo s PCR v realnem času.

**Preglednica 13:** Sonde in začetni oligonukleotidi za PCR v realnem času; tarčni gen ter rRNA 16S, nukleotidno zaporedje za smiselni in protismiselni začetni oligonukleotid ter sonda

**Table 13:** Probes, forward and reverse primers for qPCR together with target gene and 16S rRNA.

Tarčni gen/ rRNA 16S	Nukleotidno zaporedje za smiselni začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje za protismiselni začetni oligonukleotid	Sonda
<i>yeaZ</i>	CGCTGATATTGGGCCAGTAAA	GTGCTGGCAGCCATTGAC	CTTCGCCCATTCGCG
<i>ydcP</i>	GATATTGGCGCGTTGATTG	GAGATGATCTTCGCCACTTCAAT	CAGGGCGATAAAATTT
<i>groEL</i>	GCAACTCTGGTTAACACCAT	TGCAGCATAGCTTACGACGAT	AACCGCAGCGACTTT
<i>ecpD</i>	GAACACGCTCTCTGTCTTAGG	CAAACGTGGGCAAACAATCAAATT	ACAGCCAGCACCTCAC
<i>torD</i>	ACAGGACGAGCAAGAGATAAACG	CGTTGAAATTGCCGCTGGTTT	CCCTGCCCTCAACTAAC
<i>uspD</i>	CGGATAACAAGCTGTATAAACTGACGAA	GCATTCTCCCGCTTAATACG	TCGGCCATTGAATATT
rRNA 16S	GGAGTACGGCCGCAAGGT	CATGCTCCACCGCTTGTG	AAAACCTCAAATGAATTGACG

### 3.10.3 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Začetne oligonukleotide izbranih genov in rRNA 16S smo uporabili v posameznih reakcijah, tj. posamezne reakcije qPCR za vsak izbrani gen in gen rRNA 16S smo pripravili za vsak vzorec. V reakcijski mešanici so bili mešanica reagentov (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied BioSystems), začetni oligonukleotidi in cDNA izbranih vzorcev. Zaporedne redčitve posameznega vzorca cDNA (10X, 100 X, 1000X in 10000X) smo izvedli posamično za posamezen amplikon pri vsaki analizi, da bi ugotovili učinkovitost pomnoževanja. Posamezen vzorec za posamezno redčitev obratnega prepisovanja smo pripravili v dveh paralelkah (Pompe-Novak in sod., 2006). Vzorce smo analizirali v sistemu za določevanje zaporedij (ABI PRISM 7900 HT Fast Sequence Detection System, Applied Biosystems) s 384 mesti za analizo. S programom SDS 2.3 (Applied Biosystems) smo surove podatke normalizirali glede na pasivno referenčno barvilo in določili bazno linijo, prag pa smo nastavili ročno. Učinkovitost pomnoževanja vsakega posameznega amplikona smo preverili s standardno krivuljo iz rezultatov pomnoževanj zaporednih redčenj obratnega prepisovanja posameznega vzorca.

Vrednosti Ct posameznih pomnoževalnih reakcij smo nadalje uporabili za izračun relativnih vrednosti izražanja posameznih genov, glede na izražanje gena za rRNA 16S (Petek s sod., 2010). Rezultate smo izrazili kot log<sub>2</sub>-vrednosti razmerja izražanja med dvema temperaturama oziroma med sevoma. Za potrditev ustreznosti rezultatov smo uporabili t-preizkus (Baebler in sod., 2006).

### 3.11 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (NaDS-PAGE)

Elektroforeza vzorcev proteinov na poliakrilamidnih gelih omogoča ločevanje le-teh na podlagi njihove molekulske mase pod vplivom električnega polja. Pri delu smo uporabili sistem NuPAGE® Novex Bis-Tris NaDS-PAGE (Invitrogen), v katerem je od 4- do 12-odstotni gradientni gel. Vzorce smo pred tem pripravili tako, da smo zatehte raztopili v 10X volumnu 10-mM raztopine TRIS/HCl (pH = 8,0) ter jih ustrezzo redčili (zaradi manjših količin vzorcev seva bakterije *E. coli*, pripravljenih pri 25 °C, smo le-te redčili v razmerju 1 : 2). Alikvotom razredčenih vzorcev smo dodali raztopino 2X pufera SB (pufer za vzorce 4X NuPAGE® LDS razredčen z vodo MilliQ 1 : 2). Nato smo si pripravili še elektroforezni pufer ((1X) NuPAGE® MES SDS Running buffer) (preglednica 14) ter vzorce skupaj s standardom Novex Sharp MW (Invitrogen) nanesli na gel. Ločevanje proteinov je potekalo 40 minut pri 200 V, 125 mA pri sobni temperaturi. Še pred nanosom na gel smo vzorce denaturirali 10 minut pri 70 °C. Po elektroforeznem ločevanju smo proteine zaznali z barvanjem z barvilkom Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) (preglednica 15).

**Preglednica 14:** Priprava pufrov za elektroforezo NaDS-PAGE

**Table 14:** Preparation of buffers for SDS-PAGE electrophoresis

Elektroforezni pufer: NuPAGE® MES SDS Running buffer (20X) (Invitrogen) pred uporabo razredčimo z vodo MilliQ (1 : 20) in dobimo 1X MES pufer.
Vzorčni pufer (2X SB): 4X NuPAGE® LDS pufer (Invitrogen) redčimo z vodo MilliQ.

**Preglednica 15:** Barvanje z barvilkom Simply Blue

**Table 15:** Simply Blue staining

Stopnja	Raztopina	Čas (v minutah)	T (°C)
1	spiranje z vodo MilliQ	3 x 5	sobna
2	barvanje z barvilkom Simply Blue Safe Stain	30	50
3	razbarvanje z vodo MilliQ	30	sobna

### 3.12 ANALIZA PROTEINOV – PRENOS WESTERN

Prenos Western (*Western blotting*; WB) je tehnika, ki se uporablja za detekcijo proteinov v različnih vzorcih. Najprej se z elektroforezo NaDS-PAGE ločijo denaturirani proteini (NaDS je detergent, ki denaturira nativne proteine v posamezne polipeptide) na podlagi njihove molekulske mase, nato pa se prenesejo na nitrocelulozno (ali PVDF – poliviniliden fluorid) membrano. Na membrano se nato doda specifično protitelo, kar omogoča detekcijo tarčnega proteina.

Ob upoštevanju rezultatov hibridizacij mikromrež in qPCR izbranega seta genov ter na podlagi dostopnosti specifičnih protiteles smo se odločili, da preverimo izločanje še na proteinski ravni. Izbrali smo protein GroEL.

Pred izvedbo WB smo najprej pripravili raztopino pufra TBS (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl) in pufra za blokado membrane ((1X) TBS-pufer (pH = 7,4) s 5 % mlekom v prahu).

Proteine, ki smo jih ločili z elektroforezo NaDS-PAGE, smo prenesli z gela na membrano s sistemom iBlot<sup>TM</sup> Dry blotting System (Invitrogen). Zraven smo dodali standard See Blue Plus2 (Invitrogen). Sledilo je sušenje membrane na zraku približno 15 minut, zaščiteno pred svetlobo. Po sušenju smo membrano najprej sprali s puferom TBS (pH = 7,4) (omočenje membrane v pripravljeni pufer), dodali pufer za blokado membrane in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi s stresanjem. Membrano smo ponovno sprali s puferom TBS (pH = 7,4), dvakrat po 5 minut s stresanjem, ter dodali primarna protitelesa (GroEL – monoklonsko mišje protitelo, IgG1; Antibodies online GmbH) tako, da smo membrano položili v PVC-vrečko, jo zavarili s treh strani in previdno dodali pripravljeno raztopino protiteles (preglednica 16). Nato smo zavarili še četrto stran (pri tem smo preverili, da v raztopini ni bilo zračnih mehurčkov). Temu je najprej sledila inkubacija membrane eno uro pri sobni temperaturi s stresanjem, nato pa inkubacija čez noč pri 4 °C s stresanjem. Naslednji dan smo membrano z nanesenimi primarnimi protitelesi sprali s puferom TBS (pH = 7,4), štirikrat po 5 minut (s stresanjem), ter dodali raztopino sekundarnih protiteles (protimišje protitelo, IgG; HRP – Sigma) tako, da smo membrano položili v PVC-vrečko, jo zavarili s treh strani in previdno dodali pripravljeno raztopino protiteles. Nato smo zavarili še četrto stran (pri tem smo preverili, da v raztopini ni bilo zračnih mehurčkov). Sledila je inkubacija membrane eno uro pri sobni temperaturi s stresanjem, temu pa spiranje membrane s puferom TBS (pH = 7,4) štirikrat po 5 minut, s stresanjem. Po končanem spiranju smo na membrano vezana protitelesa detektirali z detekcijsko raztopino (preglednica 16), zaščiteno pred svetlobo, ter reakcijo zaustavili z

dodatkom vode MilliQ (membrano smo postavili za eno minuto v vodo MilliQ). Membrano smo posušili na zraku, zaščiteno pred svetlobo, ter jo fotografirali z digitalnim fotoaparatom.

**Preglednica 16:** Priprava detekcijske raztopine ter raztopin primarnega in sekundarnega protitelesa

**Table 16:** Preparation of detection solution and solutions for primary and secondary antibody

<b>Detekcijska raztopina:</b> Tik pred uporabo zamešamo 15 ml raztopine A in 25 ml raztopine B (sobna temperatura).
a) Raztopina A: 15 mg reagenta Color development reagent (4-kloro-1-naftol) (Sigma) raztopimo v 5 ml metanola (Merck).
b) Raztopina B: 15 µl hladnega H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dodamo v 25 ml raztopine TBS (pH = 7,5).
<b>Primarno protitelo:</b> monoklonsko mišje protitelo GroEL (ang. GroEL antibody mouse Monoclonal (9A1/2), IgG1). Raztopimo 10 µl pripravljene raztopine protitelesa v 10 ml pufra za blokado.
<b>Sekundarno protitelo:</b> proti-mišji IgG (ang. Anti-Mouse IgG). Raztopimo 10 µl pripravljene raztopine protitelesa v 10 ml pufra za blokado.

### 3.13 SEMIKVANTITATIVNO DENZITOMETRIČNO DOLOČANJE SPREMENB RAVNI IZLOČANJA PROTEINA GroEL

Gela, pridobljena z elektroforezo NaDS-PAGE, ter membrani, dobljeni z analizo po WB, smo nato analizirali s prosto dostopnim programom ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, 2010), katerega osnovno delovanje temelji na aplikaciji JAVA. Z njim izračunamo vrednosti površin in slikovnih pik izbranih regij, merimo razdalje in določimo optične gostote izbranih površin.

Dobljena gela in membrani smo v obliki slike formata TIFF prenesli v program ImageJ. Najprej smo umerili optično gostoto celotne slike izbranega gela NaDS-PAGE (enako tudi za sliko izbrane membrane WB), z ukazom Uncalibrated OD. Temu je sledil izbor stolpcev na sliki (ukazi Analyze-Gels-Select first lane ter Select next lane) ter izris spektrov posameznih stolpcev (ukaz Analyze-Gels-Plot lanes). Za vsak posamezni stolpec smo dobili spekter, ki smo ga nato integrirali, tako da smo v primeru gela, pridobljenega z elektroforezo NaDS-PAGE, dobili vrednosti za celotno površino preučevanega stolpca (vzorca), v primeru membrane, dobljene z analizo po WB, pa za površino izbranega stolpca (proteina GroEL; ukaz Analyze-Measure). Vrednosti površin posameznih stolpcev (vzorcev) gelov, pridobljenih z elektroforezo NaDS-PAGE, in membran, dobljenih z analizo po WB, smo prenesli v Excel, kjer smo z dodatnim vnosom zateht in redčenj posameznih vzorcev (celotna količina proteinov bakterije *E. coli*) izračunali iz razmerja med površinami celotnih proteinov bakterije *E. coli* in površinami proteina GroEL relativne koncentracije slednjega. Iz dobljenih vrednosti relativnih koncentracij proteina GroEL pri različnih temperaturah smo ocenili spremembe v ravni izločanja proteina GroEL.

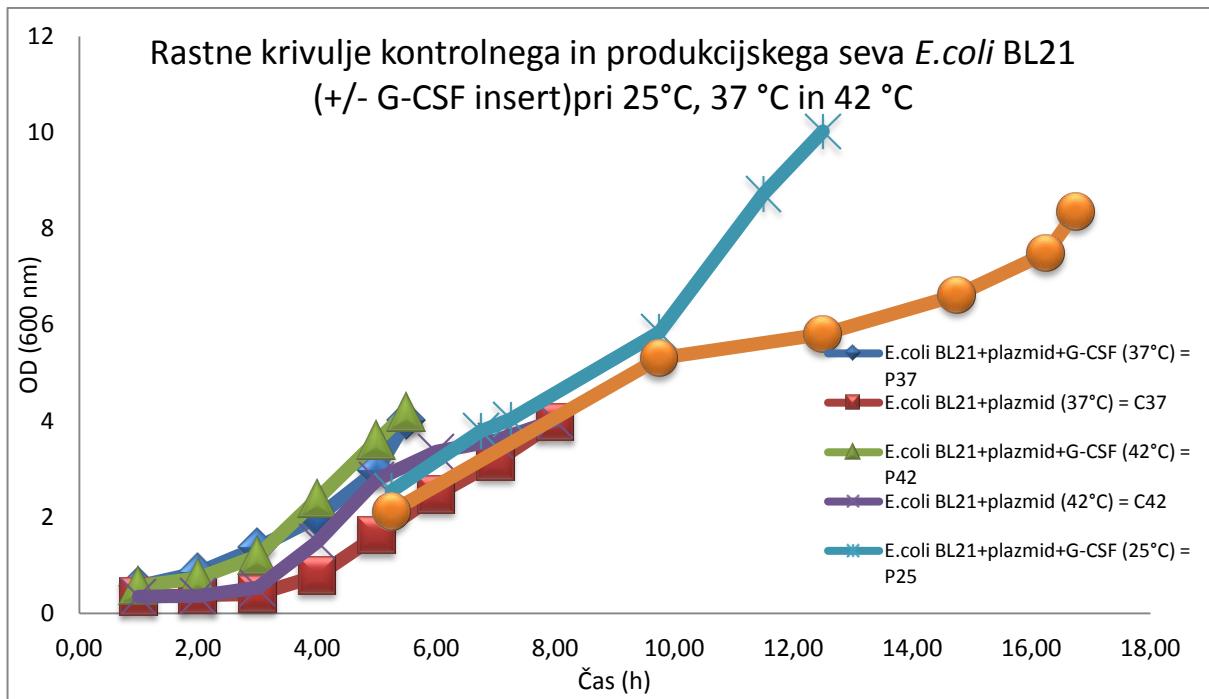
## 4 REZULTATI

### 4.1 RAST KONTROLNIH IN PRODUKCIJSKIH SEVOV

#### 4.1.1 Rastne krivulje kontrolnih in produkcijskih sevov BL21(DE3) ([pET3a/Fopt5] in [pET3a]) bakterije *E. coli*, gojenih pri treh različnih temperaturah

Da bi preučili vpliv temperature na gojenje produkcijskega seva in povezano izražanje genov, ki kodirajo šaperone in proteaze ter posledično akumulacijo proteina hG-CSF, smo kulture vzorcev produkcijskega in kontrolnega seva pripravili pri treh različnih temperaturah, in sicer pri 25 °C, 37 °C in 42 °C. Gojenje kultur pri različnih temperaturah smo prekinili, ko je bila dosežena točka, kjer se logaritemska faza rasti prevesi v stacionarno fazo rasti.

Iz grafa rastnih krivulj (slika 16) so pri omenjenih vzorcih razvidne razlike v izmerjeni optični gostoti, v točki prehoda iz logaritemske v stacionarno fazo rasti. Za kulture vzorcev, gojene pri 25 °C, smo izmerili optično gostoto (za produkcijski in kontrolni sev) pri  $OD_{600} \approx 10$ , medtem ko smo za kulture vzorcev, gojene pri 37 °C in 42 °C (za produkcijski in kontrolni sev), izmerili optično gostoto pri  $OD_{600} \approx 4$ , kar je potrjevalo ugotovitve sodelavcev (Jevševar in sod., 2007). Ob tem je pomembno še, da se je izmerjena optična gostota kontrolnega seva (*E. coli* BL21 (DE3) – pET3a brez inserta G-CSF – oznaka C), gojenega pri 25 °C, nekoliko razlikovala od rezultatov sodelavcev (Jevševar in sod., 2007), saj so naši rezultati pri 25 °C izkazovali, da je izmerjena optična gostota omenjenih vzorcev v izbrani točki (prehod iz logaritemske v stacionarno fazo rasti) nekoliko nižja, tj.  $OD_{600} \approx 8,5$ , in dosežena po približno 17 urah od prenosa kultur v gojišče GYSP produkcijske faze (preglednica 17).



**Slika 16:** Rastne krivulje vzorcev kultur produksijskega in kontrolnega seva, gojenih pri 25 °C, 37 °C in 42 °C (barva rastne krivulje, ki pripada posameznemu sevu je razložena v preglednici 17).

**Figure 16:** Growth curves of production and control strains at T = 25 °C, 37 °C and 42 °C (growth curve colour defining individual strain is explained in Table 17).

**Preglednica 17:** Primerjava končnih vrednosti biomase: optična gostota OD<sub>600</sub> pri različnih temperaturah z insertom G-CSF in brez njega pri prehodu iz logaritemsko v stacionarno fazo.

**Table 17:** comparison of OD<sub>600</sub> at different temperature for control and production strain at the transition state (from logarithm to stationary phase).

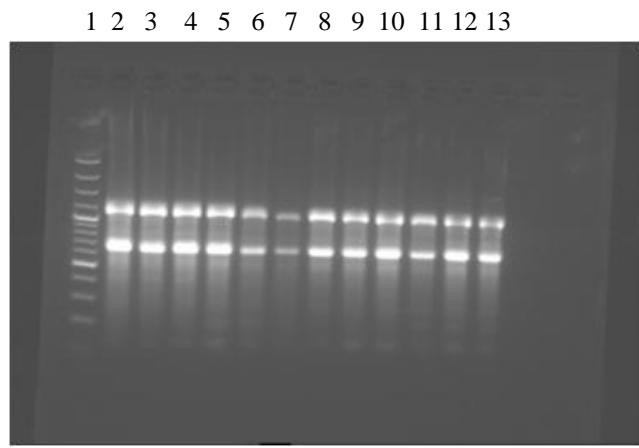
Sev	Čas (h)	Končni OD <sub>600</sub> (prehod iz logaritemsko v stacionarno fazo)
produksijski sev ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + G-CSF) (25 °C) – oznaka P <sub>25</sub> (rastna krivulja je svetlo modre barve)	12,5	10,02
kontrolni sev ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid) (25 °C) – oznaka C <sub>25</sub> (rastna krivulja je oranžne barve)	≈ 17	8,35
produksijski sev ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + G-CSF) (37 °C) – oznaka P <sub>37</sub> (rastna krivulja je temno modre barve)	5,5	4,02
kontrolni sev ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid) (37 °C) – oznaka C <sub>37</sub> (rastna krivulja je rdeče barve)	6,7	3,97
produksijski sev ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + G-CSF) (42 °C) – oznaka P <sub>42</sub> (rastna krivulja je svetlo zelene barve)	5,5	4,17
kontrolni sev ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid) (42 °C) – oznaka C <sub>42</sub> (rastna krivulja je vijolične barve)	6,7	4,01

Iz rastnih krivulj na sliki 16 je razvidno, da je točka, ko pride do prehoda iz logaritemske v stacionarno fazo (glede na predhodne potrjene eksperimentalne podatke sodelavcev (Jevševar in sod., 2007)), za kulture produkcijskega seva, gojene pri 37 °C in pri 42°C, dosežena po približno 5,5 h, ko je dosežen  $OD_{600} \approx 4,0$ , medtem ko je za isti produkcijski sev, gojen pri 25 °C, ta točka dosežena po približno 12,5 h, ko je dosežen  $OD_{600} \approx 10,0$  (preglednica 17).

Za kontrolni sev je razvidno, da je ta točka prehoda iz logaritemske v stacionarno fazo za kulture, gojene pri 37 °C in pri 42 °C, dosežena po približno 7 urah, ko je dosežen  $OD_{600} \approx 4,0$ , medtem ko je za isti kontrolni sev, gojen pri 25 °C, ta točka prehoda dosežena po približno 16,5 h, ko je dosežen  $OD_{600} \approx 8,5$ .

#### 4.2 IZOLACIJA CELOTNE RNA (totRNA)

Celotno RNA (totRNA) produkcijskega in kontrolnega seva (preglednica 18), gojenih pri različnih temperaturah, smo izolirali po postopku, opisanem v podpoglavlju 3.5. Kot je razvidno iz slike 17, smo z gelsko elektroforezo dobili pričakovane rezultate za vse paralelke kultur obeh sevov pri vseh temperaturah, saj se lepo vidita oba fragmenta ribosomske RNA, kar potrjuje, da se RNA vzorcev ni razgradila. S primerjavo z RNA-standardom smo tudi ocenili kvantiteto in kvaliteto izolirane totRNA, kar smo v nadaljevanju potrdili s spektrofotometrično meritvijo vzorcev z aparatom NanoDrop (podpoglavlje 3.5) (preglednica 18).



**Slika 17:** Primer z gelsko elektroforezo izolirane totRNA; (1) standard, 2) P37-1, 3) P37-2, 4) P37-3, 5) C37-1, 6) C37-2, 7) C37-3, 8) P42-1, 9) P42-2, 10) P42-3, 11) C42-1, 12) C42-2, 13) C42-3

**Figure 17:** gel electrophoresis of totRNA (1) standard, 2) P37-1, 3) P37-2, 4) P37-3, 5) C37-1, 6) C37-2, 7) C37-3, 8) P42-1, 9) P42-2, 10) P42-3, 11) C42-1, 12) C42-2, 13) C42-3.

Za nadaljnje hibridizacije smo uporabili po približno 30 µg izolirane totRNA za vsak posamezni vzorec.

**Preglednica 18:** Oznake vzorcev in koncentracije RNA

**Table 18:** Sample labeling and RNA concentration.

Oznaka vzorca	Pomen oznake vzorca	Koncentracija RNA (µg/µl) (NanoDrop)
P25-1	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 25 °C – paralelka 1	1065
P25-2	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 25 °C – paralelka 2	945
P25-3	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 25 °C – paralelka 3	861
C25-1	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 25 °C – paralelka 1	1152
C25-2	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 25 °C – paralelka 2	982
C25-3	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 25 °C – paralelka 3	1023
P37-1	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 37 °C – paralelka 1	2076
P37-2	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 37 °C – paralelka 2	1628
P37-3	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 37 °C – paralelka 3	1268
C37-1	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 37 °C – paralelka 1	1169
C37-2	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 37 °C – paralelka 2	1038
C37-3	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 37 °C – paralelka 3	869
P42-1	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 42 °C – paralelka 1	1852
P42-2	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 42 °C – paralelka 2	1492
P42-3	produkcijski sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid + insert G-CSF pri 42 °C – paralelka 3	1290
C42-1	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 42 °C – paralelka 1	2258
C42-2	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 42 °C – paralelka 2	1529
C42-3	kontrolni sev: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) + plazmid brez inserta G-CSF pri 42 °C – paralelka 3	1938

#### 4.3 PRIMERJAVA GENOMOV SEVOV BAKTERIJE *E. COLI* BL21 IN K-12

Da bi preučili vpliv temperature na gojenje produkcijskega in kontrolnega seva ter povezano nastajanje šaperonov in proteaz, posledično pa akumulacijo proteina hG-CSF, smo uporabili mikromreže podjetja CombiMatrix (CombiMatrix - DNA microarrays, 2010), ki so pripravljene za sev bakterije *Escherichie coli* K-12. Zato smo najprej preverili, ali so omenjene mikromreže ustrezne za proučevanje seva bakterije *E. coli* BL21.

Hibridizirali smo genomsko DNA seva bakterije *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) brez plazmidnega vektorja in brez inserta za protein hG-CSF, kontrolni sev bakterije *E. coli* BL21(DE3) s plazmidnim vektorjem in brez inserta za protein hG-CSF, produkcijski sev bakterije *E. coli* BL21(DE3) s plazmidnim vektorjem in z insertom za protein hG-CSF [Fopt5] ter sev bakterije *E. coli* K12. Na podlagi pregleda vseh omenjenih mikromrež (primerjali smo dobljene intenzitete emitirane fluorescence posameznih genov, dobljene pri hibridizacijah vseh mikromrež) smo ugotovili, da so mikromreže podjetja CombiMatrix primerne za proučevanje genoma *E. coli* BL21.

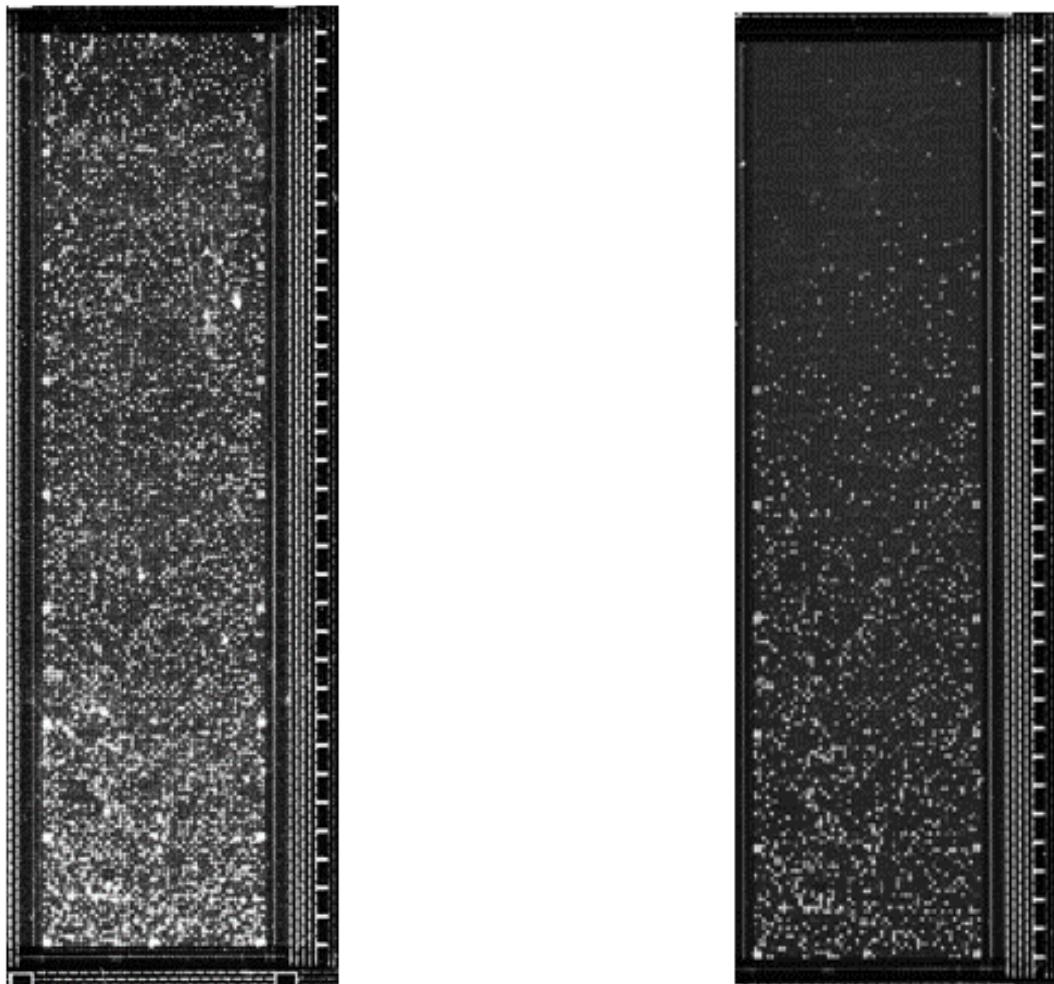
#### 4.4 REZULTATI ANALIZ Z DNA-MIKROMREŽAMI

Da bi preučili vpliv temperature na nastanek različnih proteaz in šaperonov bakterije *E. coli* in identificirali dejavnike, ki vplivajo na nastanek neklašičnih inkluzijskih teles, smo pripravili 17 vzorcev, ki smo jih hibridizirali na mikromrežah (preglednica 18). Enega vzorca ( $25^{\circ}\text{C}$ , kontrolni sev) nismo uspeli hibridizirati, saj se je njegova RNA razgradila pri postopku izolacije. Dobljene rezultate smo analizirali, kot je opisano v podpoglavljih 3.8, 3.9 in 3.10.

Kot je razvidno iz slik mikromrež (sliki 18 in 19), se intenziteta emitirane fluorescence v zgornjih dveh tretjinah površine posamezne mikromreže razlikuje med posameznimi hibridizacijami, kar je bila najverjetnejše posledica tehničnih težav, ki so se pojavile pri zaporednem branju velikega števila mikromrež. Ker pa mikromreže podjetja CombiMatrix vsebujejo vsak posamezni gen bakterije *E. coli* v treh ponovitvah, ki so enakomerno razporejene po površini, in ker velja, da je statistično vrednotenje rezultatov zanesljivejše, če analiziramo skupino podatkov, ki izkazuje podobne karakteristike, smo se odločili, da za nadaljnji potek raziskav uporabimo samo spodnjo tretjino površine posamezne mikromreže, kar pa ni drastično zmanjšalo števila proučevanih genov.

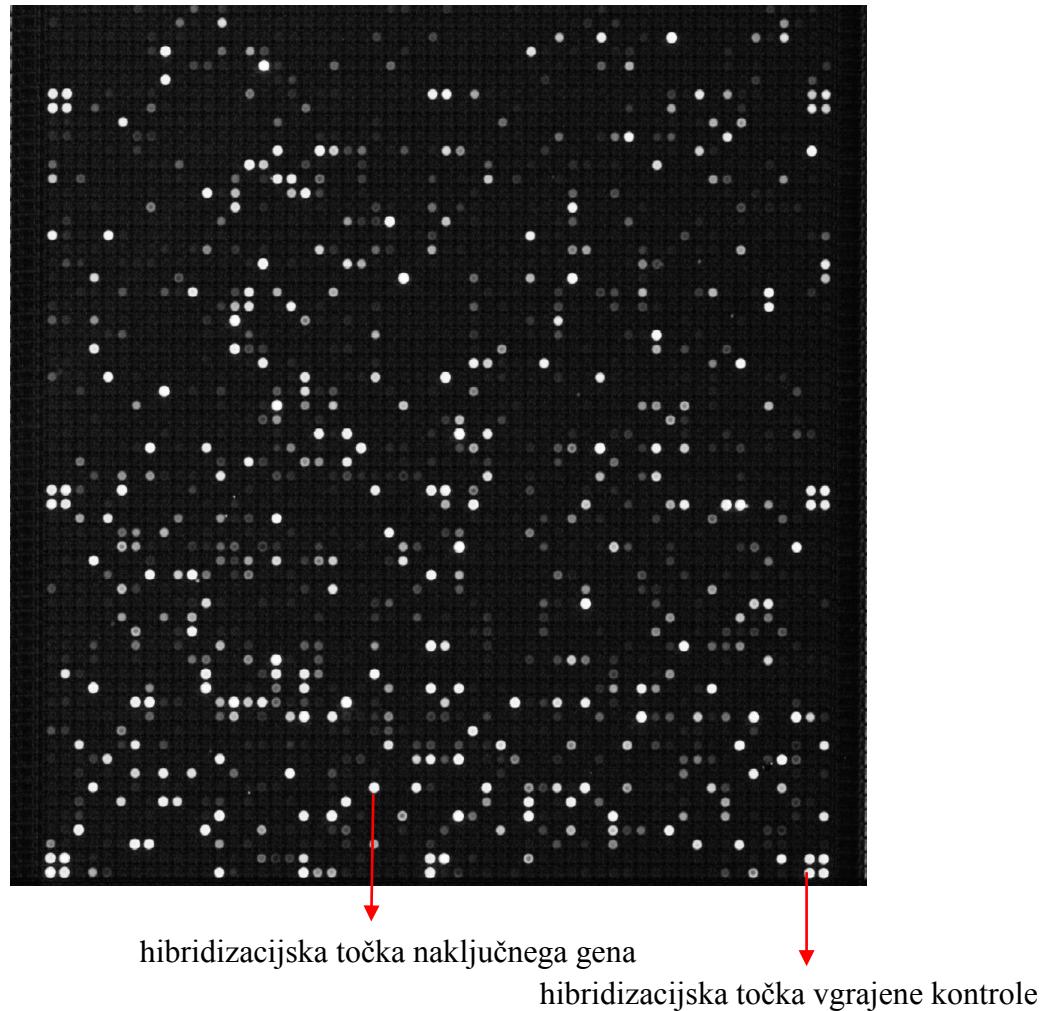
a) BL21(DE3) – pET3a - [Fopt5] 25°C

b) BL21(DE3) – pET3a - [Fopt5] 37°C



**Slika 18:** Prikaz rezultata mikromrežne analize vzorcev produkcijskega seva, gojenega pri 25 °C (a) in pri 37 °C (b)

**Figure 18:** Representative microarrays of production strain grown at T = 25 °C (a) and at T = 37 °C (b).



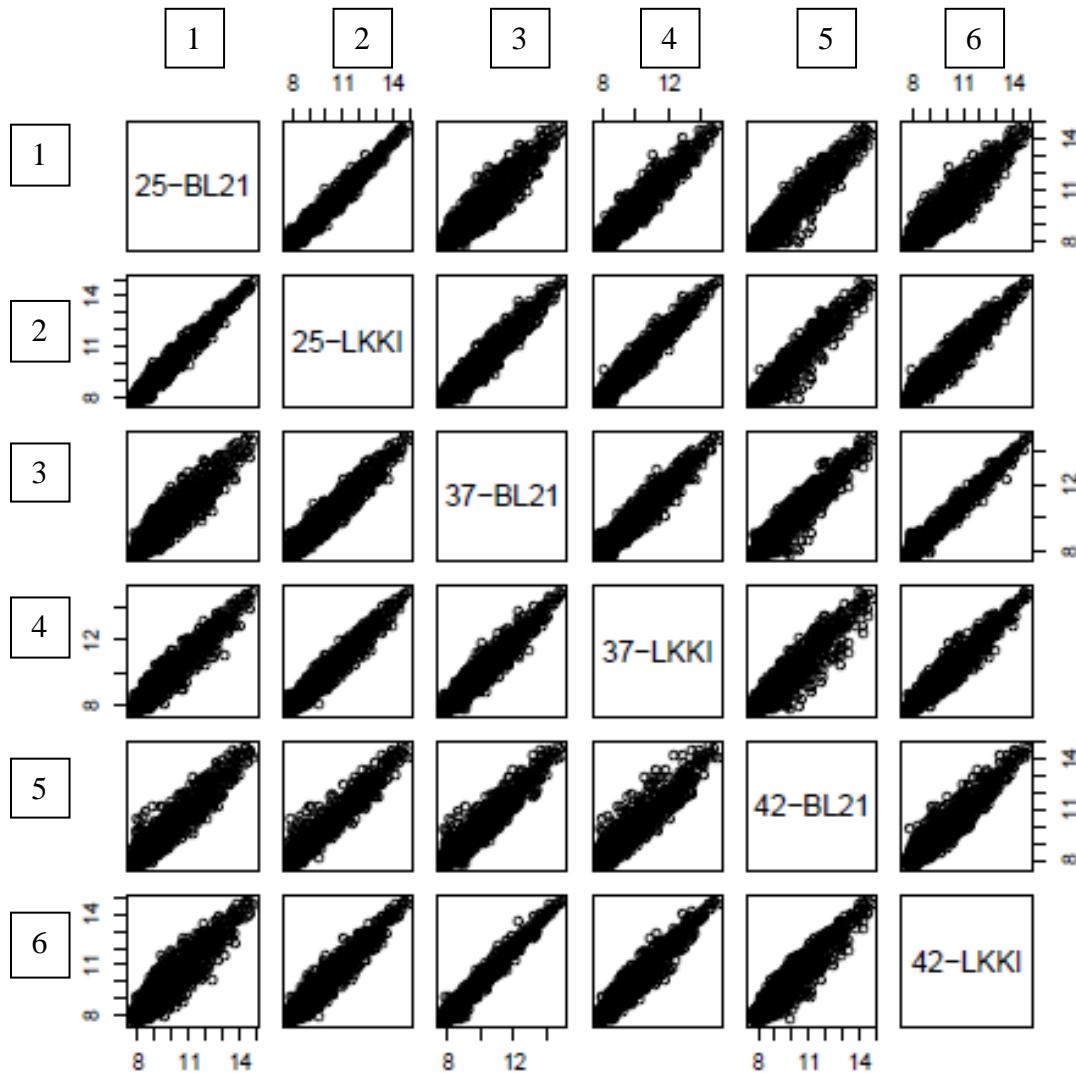
**Slika 19:** Povečana slika dela mikromreže enega od vzorcev po hibridizaciji.

**Figure 19:** Zoomed in representative microarray after hybridization.

#### 4.5 KVANTILNA NORMALIZACIJA REZULTATOV HIBRIDIZACIJ MIKROMREŽ

Kot smo že omenili v podpoglavljih 3.8, 3.9 in 4.4, smo dobljene signale posameznih točk vseh mikromrež kvantilno normalizirali, s čimer smo popravili učinke nelinearnih razmerij med visokimi in nizkimi vrednostmi porazdelitev intenzitet posameznih točk (Pierce in sod., 2007). Na sliki 20 so prikazana razmerja med povprečji posameznih paralelk kvantilno normaliziranih vrednosti intenzitet posameznih točk na mikromrežah med posameznimi temperaturami. Kvadrati na diagonali predstavljajo temperaturo in lastnost posameznega seva (preglednica 19), kvadrati levo ozziroma desno od teh pa primerjalne normalizirane vrednosti

povprečij. Številčne vrednosti na oseh x in y predstavljajo  $\log_2$  povprečne vrednosti posameznih primerjav. S kvantilno normalizacijo smo tako popravili nelinearna razmerja med posameznimi vrednostmi povprečij. To nam je omogočilo stvarnejšo primerjavo med  $\log_2$  vrednostmi povprečij različnih paralelk intenzitet med različnimi temperaturami za posamezne gene.



**Slika 20:** Primerjava povprečij kvantilno normaliziranih podatkov med različnimi temperaturami – matrika 6 x 6. Kvadrati na diagonali predstavljajo temperaturo in lastnost posameznega seva, kvadrati levo oziroma desno od teh pa primerjalne normalizirane vrednosti povprečij. Številčne vrednosti na oseh x in y predstavljajo  $\log_2$  povprečne vrednosti posameznih primerjav.

**Figure 20:** Comparisons of quantile normalized data – matrix 6 x 6. Squares that are found on the diagonal represent temperature and strain dependent characteristics, squares on the left and right represent normalized values. Numerical values on x and y axis represent  $\log_2$  average values of individual comparison.

**Preglednica 19:** Razlaga oznak kvadratov kvantilne normalizacije

**Table 19:** Legend of quantile normalization.

Oznaka kvadrata	Pomen oznake
25-BL21 (= C25)	kvantilno normalizirane $\log_2$ vrednosti povprečja intenzitet treh paralelk kontrolnega seva ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) brez inserta G-CSF) pri 25 °C
25-LKKI (= P25)	kvantilno normalizirane $\log_2$ vrednosti povprečja intenzitet dveh paralelk produkcijskega seva ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) z insertom G-CSF) pri 25 °C
37-BL21 (= C37)	kvantilno normalizirane $\log_2$ vrednosti povprečja intenzitet treh paralelk kontrolnega seva ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) brez inserta G-CSF) pri 37 °C
37-LKKI (= P37)	kvantilno normalizirane $\log_2$ vrednosti povprečja intenzitet treh paralelk produkcijskega seva ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) z insertom G-CSF) pri 37 °C
42-BL21 (= C42)	kvantilno normalizirane $\log_2$ vrednosti povprečja intenzitet treh paralelk kontrolnega seva ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) brez inserta G-CSF) pri 42 °C
42-LKKI (= P42)	kvantilno normalizirane $\log_2$ vrednosti povprečja intenzitet treh paralelk produkcijskega seva ( <i>E. coli</i> BL21 (DE3) z insertom G-CSF) pri 42 °C

#### 4.6 PREGLED RAZLIK V IZRAŽANJU POSAMEZNIH GENOV

Da bi identificirali razlike v izražanju posameznih genov, smo na podlagi postavljenega statističnega modela preučili naslednje primerjave:

- kontrolni sev, gojen pri 37 °C, glede na 25 °C (C37\_25)
- kontrolni sev, gojen pri 42 °C, glede na 25 °C (C42\_25)
- produkcijski sev, gojen pri 37 °C, glede na 25 °C (P37\_25)
- produkcijski sev, gojen pri 42 °C, glede na 25 °C (P42\_25)

Primerjali smo tudi:

- kontrolni in produkcijski sev, gojen pri 25 °C (P\_C25)
- kontrolni in produkcijski sev, gojen pri 37 °C (P\_C37)
- kontrolni in produkcijski sev, gojen pri 42 °C (P\_C42)

Od 4018 preučevanih genov na posamezni mikromreži (preglednica 20) smo dobili približno 13 % statistično značilno različno izraženih genov, če smo primerjali kontrolni sev, gojen pri 37 °C, glede na 25 °C, približno 10 %, če smo primerjali kontrolni sev, gojen pri 42 °C, glede na 25 °C in približno 3 %, če smo primerjali produkcijski sev, gojen pri 37 °C ali pri 42 °C, glede na 25 °C (preglednica 20). Primerjave pri isti temperaturi med kontrolnim in produkcijskim sevom so pokazale (preglednica 31), da je največ sprememb v izražanju genov pri zvišani temperaturi; tj. pri 42 °C. Prav nasprotno smo pri 37 °C ugotovili, da noben za našo

raziskavo zanimiv gen iz skupine genov, ki nosijo zapis za šaperone in proteaze ter ostale stresne proteine ni bil statistično značilno različno izražen. Na podlagi teh rezultatov smo predvidevali, da je vpliv produkcije rekombinantnega proteina pri optimalni temperaturi rasti bakterije *E. coli* zanemarljiv in nima bistvenega vpliva na izražanje genov bakterije *E. coli*. Pri 25 °C so bili statistično značilno različno izraženi le štirje za našo raziskavo zanimivi geni (preglednica 31).

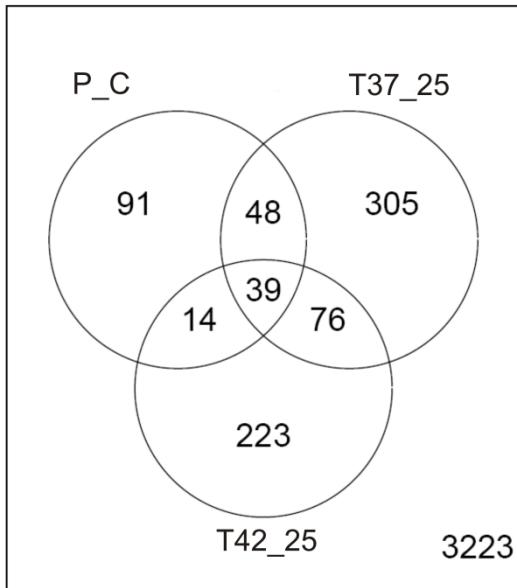
**Preglednica 20:** Število statistično značilno različno izraženih genov

**Table 20:** Number of significantly expressed genes.

Sev	Razlike v izražanju genov (primerjava med dvema temperaturama)	Število statistično značilno različno izraženih genov ( $p < 0,05$ )	Število statistično značilno različno izraženih genov ( $p < 0,05$ in $-0,5 > \log FC > 0,5$ )	Število statistično značilno različno izraženih genov ( $p < 0,05$ in $-0,5 > \log FC > 0,5$ ), ki nosijo zapis za proteine z neznano funkcijo delovanja
<b>Kontrolni sev</b>	<b>C42_25</b>	402	226	11
	<b>C37_25</b>	503	282	18
<b>Produkcijski sev</b>	<b>P42_25</b>	122	34	0
	<b>P37_25</b>	129	28	0

Med vsemi značilno različno izraženimi geni, upoštevajoč logFC pri 37 °C ali pri 42 °C glede na 25 °C, produkcijskega seva bakterije *E. coli* ni bilo niti enega gena, ki bi nosil zapis za protein z neznano funkcijo delovanja (preglednica 20).

V nadaljevanju smo s preizkusom ANOVA za preučevanje dveh neodvisnih spremenljivk preučili sočasni vpliv produkcije rekombinantnega proteina in temperature rasti (rezultati so predstavljeni v poglavju Priloge). Podobno kot z opisanim linearnim statističnim modelom smo dobili približno 7 % (največ 305 genov) statistično značilno različno izraženih genov, če smo primerjali seve (produkcijske in kontrolne), gojene pri 37 °C ali pri 42 °C glede na 25 °C. V primeru primerjav med kontrolnim in produkcijskim sevom pa smo dobili približno 2 % (največ 91 genov) statistično značilno različno izraženih genov, če smo primerjali različne temperature gojenja (25 °C, 37 °C ali 42 °C) (slika 21).



**Slika 21:** Vennov diagram statistično značilno različno izraženih genov z analizo ANOVA. P\_C – spremembe v izražanju genov v odvisnosti od posameznega seva, T37\_25, T42\_25 – spremembe v izražanju genov v odvisnosti od temperature gojenja ( $p < 0,05$ )

**Figure 21:** Venn diagram of differentially expressed genes identified by analysis of variance. P\_C: strain dependent changes in gene expression, T37\_25, T42\_25 – temperature dependent changes in gene expression. p-value cut-off 0.05.

Za lažjo interpretacijo rezultatov smo dobljena statistično značilna različna izražanja genov preverili tudi z analizo po metodi GSEA (angl. *Gene Set Enrichment Analysis*). Pri tem smo si pomagali s podatkovno zbirko EcoCyc (Pathway Tools Omics Viewer, 2012). Iz rezultatov (preglednica 21) je razvidno, da je bilo največ sprememb v izražanju genov pri različnih temperaturah v metabolnih in regulatornih poteh bakterije *E. coli* v primeru produkcijskega seva. Kar zadeva spremembe v ravni izražanja genov v metabolnih in regulatornih poteh bakterije *E. coli* neodvisno od seva pa se število genov, ki so imeli negativno oziroma pozitivno raven izražanja, ni bistveno razlikovalo.

**Preglednica 21:** Funkcijska analiza statistično značilno različno izraženih genov po metodi GSEA. Predstavljene so razlike v izražanju genov glede na njihove biološke in funkcionalne značilnosti (razredi GO), upoštevajoč  $p < 0,05$ . Pozitivne in negativne ravni izražanja posameznih genov so bile določene posamezno. P-produkcijski sev, C-kontrolni sev, 37\_25, 42\_37, 42\_25 – primerjava statistično značilno različno izraženih genov identificiranih glede na različno temperaturo gojenja.

**Table 21:** Functional analysis of changes in gene expression using GSEA. GO terms identified as significantly enriched ( $p < 0,05$ ) are presented. Up and down regulated genes were analysed separately. P- production strain, C-control strain, 37\_25, 42\_37, 42\_25-comparison of differentially expressed genes identified due to different growth temperature.

	Primerjava		Primerjava	
	C37_25		P37_25	
	Pozitivna raven izražanja	Negativna raven izražanja	Pozitivna raven izražanja	Negativna raven izražanja
<b>Razredi GO</b>	0005198 strukturna aktivnost molekule 0005576 zunajcelična regija 0006096 glikoliza 0008198 vezava iona Fe 0009245 biosinteza lipida A 001018 vezava FMN	0003676 vezava nukleinskih kislin 0003887 sinteza DNA ob prisotnosti DNA-matrice in DNA-polimeraze 0008080 aktivnost N-acetyltransferaze 0019843 vezava rRNA	0006144 metabolizem purina 0009086 biosinteza metionina 0043190 kompleks (ABC) transporterja – vezava ATP	0003723 vezava RNA 0003735 strukturni gradnik ribosoma 0005840 ribosom 0006412 translacija 0006935 kemotaksa 0009103 biosinteza lipopolisaharidov 0009279 zunajcelična membrana 0015288 aktivnost porina 0015453 aktivnost transmembranskega transporterja – oksidacija/redukcija 0019843 vezava rRNA 0030529 kompleks proteina ribonukleotida 0030964 kompleks NADH-dehidrogenaze 0046930 kompleks por 0048038 vezava kinona

se nadaljuje

**Preglednica 21:** Funkcijska analiza statistično značilno različno izraženih genov po metodi GSEA. Predstavljene so razlike v izražanju genov glede na njihove biološke in funkcionalne značilnosti (razredi GO), upoštevajoč  $p < 0,05$ . Pozitivne in negativne ravni izražanja posameznih genov so bile določene posamezno. P-produkcijski sev, C-kontrolni sev, 37\_25, 42\_37, 42\_25 – primerjava statistično značilno različno izraženih genov identificiranih glede na različno temperaturo gojenja.

**Table 21:** Functional analysis of changes in gene expression using GSEA. GO terms identified as significantly enriched ( $p < 0,05$ ) are presented. Up and down regulated genes were analysed separately. P- production strain, C-control strain, 37\_25, 42\_37, 42\_25-comparison of differentially expressed genes identified due to different growth temperature.

nadaljevanje

	C42_25		P42_25	
	Pozitivna raven izražanja	Negativna raven izražanja	Pozitivna raven izražanja	Negativna raven izražanja
Razredi GO	0005624 membranski del 0005829 citosol 0006096 glikoliza <b>0006457 zvijanje proteinov</b> 0006950 odziv na stres 0009408 odziv na visoko temperaturo 0042802 vezava podobnih proteinov 0045454 homeostaza celičnega potenciala 0051082 vezava nepravilno zvitih proteinov 0051301 delitev celice	008152 proces metabolnih poti	0000156 aktivnost odziva regulatorja 0000160 sistem prevajanja signala 0004812 aktivnost aminoacil-tRNA-ligaze <b>0006457 zvijanje proteinov</b> 0008233 aktivnost peptidaze 0009408 odziv na visoko temperaturo 0042803 aktivnost homodimerizacije proteinov 0045454 homeostaza celičnega potenciala 0051082 vezava nepravilno zvitih proteinov	0000049 vezava tRNA 0003723 vezava RNA 0003735 strukturni gradnik ribosoma 0003924 aktivnost GTPaze 0005525 vezava GTP 0005840 ribosom 0006412 translacija 0009060 aerobno dihanje 0009279 zunajcelična membrana 0015288 aktivnost porina 0015453 aktivnost transmembranskega transporterja – oksidacija/redukcija 0016597 vezava aminokislin 0019843 vezava rRNA 0030529 kompleks proteina ribonukleotida 0046930 kompleks por

se nadaljuje

**Preglednica 21:** Funkcijska analiza statistično značilno različno izraženih genov po metodi GSEA. Predstavljene so razlike v izražanju genov glede na njihove biološke in funkcionalne značilnosti (razredi GO), upoštevajoč  $p < 0,05$ . Pozitivne in negativne ravni izražanja posameznih genov so bile določene posamezno. P-produkcijski sev, C-kontrolni sev, 37\_25, 42\_37, 42\_25 – primerjava statistično značilno različno izraženih genov identificiranih glede na različno temperaturo gojenja.

**Table 21:** Functional analysis of changes in gene expression using GSEA. GO terms identified as significantly enriched ( $p < 0,05$ ) are presented. Up and down regulated genes were analysed separately. P- production strain, C-control strain, 37\_25, 42\_37, 42\_25-comparison of differentially expressed genes identified due to different growth temperature.

nadaljevanje

	C42_37			P42_37
	Pozitivna raven izražanja	Negativna raven izražanja	Pozitivna raven izražanja	Negativna raven izražanja
<b>Razredi GO</b>				

V preglednici 21 so predstavljene razlike v izražanju genov glede na njihove biološke in funkcionalne značilnosti (razredi GO), upoštevajoč  $p < 0,05$  glede na sev in glede na temperaturo gojenja.

#### **4.6.1 Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu energetskih poti, aminokislin, nukleotidov ter v biosintezi kofaktorjev in sekundarnih metabolitov**

Statistično značilno različno izražene gene po hibridizaciji dobljenih rezultatov, ki sodelujejo v metabolnih in regulatornih poteh bakterije *E. coli*, smo preslikalina celosten diagram celičnih funkcij bakterije *E. coli* v podatkovni zbirki EcoCyc (Pathway Tools Omics Viewer, 2010). Funkcionalno smo lahko interpretirali povprečno 44 % statistično značilno različno izraženih genov (preglednici 22 in 22a ter sliki 21 in 22). Iz rezultatov je razvidno, da smo pri primerjavi kontrolnih sevov, gojenih pri 37 °C ali pri 42 °C (posamezno) glede na 25 °C dobili več statistično značilno različno izraženih genov kot pri primerjavi produkcijskih sevov, gojenih pri 37 °C ali pri 42 °C (posamezno) glede na 25 °C (sliki 21 in 22 in preglednica 22). Če smo primerjali kontrolni in produkcijski sev pri isti temperaturi, smo prav tako funkcionalno interpretirali povprečno 45 % statistično značilno različno izraženih genov (preglednici 22 in 22a ter sliki 21 in 22).

**Preglednica 22:** Število statistično značilno različno izraženih genov glede na podatkovno zbirko EcoCyc – primerjava kontrolnega oz. produkcijskega seva pri različnih temperaturah (<http://www.ecocyc.org/expression.html>, 21. maj 2010)

**Table 22:** Number of significantly expressed genes according to EcoCyc database – comparison of control or production strain at different temperatures (<http://www.ecocyc.org/expression.html>, 21. 5. 2010).

Sev	Razlike v izražanju genov (primerjava med dvema temperaturama)	Število vseh statistično značilno različno izraženih genov (p < 0,05 in -0,5 > logFC > 0,5)	Število statistično značilno različno izraženih genov (p < 0,05 in -0,5 > logFC > 0,5), preslikanih na diagram pregleda celičnih funkcij bakterije <i>E. coli</i>
<b>Kontrolni sev</b>	<b>C42_25</b>	226	94
	<b>C37_25</b>	282	134
<b>Produkcijski sev</b>	<b>P42_25</b>	34	14
	<b>P37_25</b>	28	14

**Preglednica 22a:** Število statistično značilno različno izraženih genov glede na podatkovno zbirk EcoCyc – primerjava kontrolnega s produkcijskim sevom pri različnih temperaturah (<http://www.ecocyc.org/expression.html>, 21. maj 2010)

**Table 22a:** Number of significantly expressed genes according to EcoCyc database – comparison of control to production strain at different temperatures (<http://www.ecocyc.org/expression.html>, 21. 5. 2010).

Razlike v izražanju genov (primerjava med dvema sevoma pri isti temperaturi)	Število vseh statistično značilno različno izraženih genov ( $p < 0,05$ in $-0,5 > \log FC > 0,5$ )	Število statistično značilno različno izraženih genov ( $p < 0,05$ in $-0,5 > \log FC > 0,5$ ), preslikanih na diagram pregleda celičnih funkcij bakterije <i>E. coli</i>
<b>P_C25</b>	105	52
<b>P_C37</b>	74	32
<b>P_C42</b>	161	67



**Slika 22:** Pregled sprememb v izražanju genov rekombinantne bakterije *E. coli*, gojene pri 37 °C, glede na 25 °C (<http://biocyc.org/ECOLI/overview-expression-map>, 21. maj 2010)

Prikazani so statistično značilno različno izraženi geni, ki sodelujejo v metabolnih in regulatornih poteh bakterije *E. coli* za kontrolni sev pri 37 °C glede na 25 °C. Črte v diagramu predstavljajo reakcije, liki pa celične komponente (□ – ogljikovi hidrati, △ – aminokisline, ◇ – proteini, ▽ – kofaktorji, T – tRNA, ○ – ostalo). Metabolne poti biosinteze so prikazane na levi strani citoplazme, poti razgradnje so na desni strani citoplazme, signalne poti pa spodaj levo. Reakcije, ki niso del metabolnih poti, so skrajno desno. V prostoru notranje in zunanje membrane so zasidrani transporterji (označeni s puščicami), v periplazmi so periplazemski encimi in ostali proteini. LogFC-razmerja statistično značilno različno izraženih genov so prikazana barvno glede na barvno lestvico na sliki. Na sliki so prikazane tudi rdeče črke, ki označujejo področja celičnega delovanja. A – kofaktorji, zaščitne skupine, biosinteza prenašalcev elektronov; B – biosinteza maščobnih kislin in lipidov; C – poti prenosa signalov; D – glikoliza; E – fermentacija; F – dihanje; G – poti fosfatov; H – poti sinteze aminoacil – tRNA; I – biosinteza aminov in poliaminov; J – biosinteza celičnih struktur, K – poti glikolize in Entner-Doudoroffa; L – biosinteza ogljikovih hidratov; M – metabolizem anorganskih hranil; N – poti razgradnje aldehydov; O – poti recikliranja razgradnje nukleozidov in nukleotidov; P – poti razgradnje sekundarnih metabolitov; Q – poti uporabe in asimilacije C1-komponent; R – poti razgradnje ogljikovih hidratov; S – poti razgradnje aminokislin; T – poti razgradnje alkoholov; U – transporterji.

**Figure 22:** Overview of changes in comparisons of gene expressions at T = 37 °C and T = 25 °C (<http://biocyc.org/ECOLI/overview-expression-map>, 21.5.2010).

Differences in gene expression for genes involved in metabolic and regulatory pathways of *E. coli* observed in control strain grown at T = 37 °C and T = 25 °C are presented. Lines in the diagram correspond to reactions; nodes correspond to cell components (□ – carbohydrates, △ - amino acids, ◇ - proteins, ▽ - cofactors, T – tRNA, ○ - other). Biosynthetic pathways are positioned in the left of the cytoplasm, degradative pathways in the right, signaling pathways in the bottom-left. Reactions not assigned to any pathway are in the far right of the cytoplasm. In the inner and outer membranes are transporters (with arrows) and other periplasmic proteins. In the periplasm are periplasmic enzymes and other periplasmic proteins. LogFC ratios of DE genes are presented coloured according to the scale on the image. Each figure (A and B) is marked with red letters to show cellular function. A – cofactors, prosthetic groups, electron carriers biosynthesis; B – fatty acids and lipids biosynthesis; C – signal transduction pathways; D – glycolysis; E – fermentation; F – respiration; G – pentose phosphate pathways; H – amines and polyamines biosynthesis; I – superpathway of glycolysis and Entner-Doudoroff; J – inorganic nutrients metabolism; K – secondary metabolites degradation; L – alcohols degradation; M – transporters.



**Slika 23:** Pregled sprememb v izražanju genov rekombinantne bakterije *E. coli*, gojene pri 42 °C, glede na 25 °C (<http://biocyc.org/ECOLI/overview-expression-map>, 21. maj 2010)

Prikazani so statistično značilno različno izraženi geni, ki sodelujejo v metabolnih in regulatornih poteh bakterije *E. coli* za kontrolni sev pri 42 °C glede na 25 °C. Razlaga slike je enaka kot pri sliki 22.

**Figure 23:** Overview of changes in comparisons of gene expressions at  $T = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (<http://biocyc.org/ECOLI/overview-expression-map>, 21.5.2010).

Differences in gene expression for genes involved in metabolic and regulatory pathways of *E. coli* observed in control strain grown at  $T = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  are presented. Explanation is the same as the one presented under Figure 22.

Iz rezultatov ugotovimo, da je do statistično značilno različnih sprememb v ravneh izražanja genov prišlo v energetskem metabolizmu (preglednice 23, 24 in 28), metabolizmu aminokislin (preglednici 25 in 29), nukleotidov (preglednica 26) ter v biosintezi kofaktorjev in sekundarnih metabolitov (preglednici 27 in 30). Nekaj statistično značilno različno izraženih genov smo opazili tudi v skupini transporterjev in signalnih poteh.

V preglednicah od 23 do 27 so predstavljene primerjave izražanja genov v kontrolnem sevu bakterije *E. coli* pri različnih temperaturah (C42\_25, C37\_25). Vsi identificirani statistično značilno različno izraženi geni z negativnim logFC za posamezno primerjavo med temperaturami so označeni z (-), vsi statistično značilno različno izraženi geni s pozitivnim logFC za posamezno primerjavo med temperaturami pa s (+).

**Preglednica 23:** Temperaturno odvisne spremembe v energetskih poteh rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3)

**Table 23:** Temperature dependent changes in energy metabolism of recombinant BL21 (DE3) strain.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov kontrolnega seva (primerjava med dvema temperaturama)	
<b>Celična funkcija</b>				
<b>Poti uporabe in asimilacije C1-komponent</b>				C37_25      C42_25
<i>frmA</i>	formaldehid dehidrogenaza	oksidacija formaldehidov II	(-)	(-)
<b>Razgradnja alkoholov</b>				
<i>glpB</i>	3-fosfat-glicerol dehidrogenaza (anaerobna)	razgradnja glicerola tipa I	(+)	(+)
<i>glpD</i>	3-fosfat-glicerol dehidrogenaza (aerobna)	razgradnja glicerola tipa I	(+)	(+)
<b>Biosinteza ogljikovih hidratov</b>				
<i>eno</i>	enolaza	glukoneogeneza tipa I	(+)	
<i>ybhA</i>	fosfataza piridoksala/1,6-bisfosfataza fruktoze	glukoneogeneza tipa I	(-)	
<i>galM</i>	1-galaktoza epimeraza	razgradnja galaktoze tipa I (metabolna pot Leloira)	(+)	
<i>rbsD</i>	riboza-piranaza	razgradnja riboze	(-)	
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	Glukoneogeneza tipa I		(+)
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	glukoneogeneza tipa I		(+)
<i>mngB</i>	$\alpha$ -manozidaza	razgradnja 2-O- $\alpha$ -manozil-D-glicerata	(-)	(-)
<i>araB</i>	L-ribulokinaza	razgradnja L-arabinoze	(-)	(-)
<b>Biosinteza maščobnih kislin in lipidov</b>				
<i>lpxP</i>	palmitoleoil acetiltransferaza	pot KDO2 biosinteze lipida A		(-)
<i>waaA</i>	KDO-transferaza	biosinteza prekurzorja lipida A	(+)	
<i>cfa</i>	sintaza fosfolipidne ciklopropsanske acilmaščobne kisline	biosinteza ciklopropsanskih maščobnih kislin (CFA)	(+)	
<i>waaA</i>	KDO-transferaza	pot KDO2 biosinteze lipida A	(+)	
<b>Fermentacija</b>				
<i>acnB</i>	2-metilizocitrat dehidrataza	2-metilcitrat cikla tipa I	(-)	(-)
<i>acnB</i>	2-akonitat hidrataza (dvojna funkcija delovanja)	anaerobna fermentacija (laktat, acetat in format)	(-)	(-)
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	anaerobna fermentacija (laktat, acetat in format)		(+)
<i>pykF</i>	piruvat kinaza tipa I	anaerobna fermentacija (laktat, acetat in format)	(+)	
<i>ldhA</i>	D-laktat dehidrogenaza	anaerobna fermentacija (laktat, acetat in format)	(-)	
<i>frdB</i>	reduktaza fumarata FeS-proteina	anaerobna fermentacija (laktat, acetat in format)	(-)	

**Preglednica 24:** Temperaturno odvisne spremembe v energetskih poteh rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3) (nadaljevanje)

**Table 24:** Temperature dependent changes in energy metabolism of recombinant BL21 (DE3) strain.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov kontrolnega seva (primerjava med dvema temperaturama)	
<b>Celična funkcija</b>				
<b>Glikoliza</b>			C37_25	C42_25
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)		(+)
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)		(-)
<i>sucC</i>	sukcinil-CoA sintetaza ( $\beta$ -podenota)	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)		(-)
<i>acnB</i>	2-akonitat hidrataza (dvojna funkcija delovanja)	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)		(-)
<i>ybhA</i>	fosfataza piridokksala/1,6-bisfosfataza fruktoze	glikoliza tipa I	(-)	
<i>pfkB</i>	6-fosfofruktokinaza tipa II	glikoliza tipa I (Etner-Doudoroff)	(+)	
<i>eno</i>	enolaza	glikoliza tipa I (Etner-Doudoroff)	(+)	
<i>pykF</i>	piruvat kinaza tipa I	glikoliza tipa I (Etner-Doudoroff)	(+)	
<i>ybhA</i>	fosfataza piridokksala/1,6-bisfosfataza fruktoze	glikoliza tipa I – Krebsov cikel	(-)	
<i>aceB</i>	malat sintaza A	glikoliza tipa I – Krebsov cikel	(-)	
<i>acnB</i>	akonitat hidrataza 2 (dvojna funkcija delovanja)	glikoliza tipa I – Krebsov cikel	(-)	
<i>pfkA</i>	malat sintaza A	glikoliza tipa I – Krebsov cikel	(+)	
<i>eno</i>	enolaza	glikoliza tipa I – Krebsov cikel	(+)	
<i>pykF</i>	piruvat kinaza tipa I	glikoliza tipa I – Krebsov cikel	(+)	
<b>Metabolizem anorganskih hranil</b>				
<i>ssuD</i>	od FMNH <sub>2</sub> -odvisna alkansulfonatna monooksigenaza	dvakomponentna alkansulfonatna monooksigenaza	(-)	(-)
<i>cysH</i>	3'-fosfoadenililsulfat reduktaza	redukcija sulfatov tipa I		(+)
<i>cysJ</i>	sulfit reduktaza	redukcija sulfatov tipa I		(+)
<b>Dihanje</b>				
<i>acnB</i>	akonitat hidrataza 2 (dvojna funkcija delovanja)	anaerobno dihanje	(-)	(-)
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	anaerobno dihanje		(+)
<i>pykF</i>	piruvat kinaza tipa I	anaerobno dihanje	(+)	
<i>eno</i>	enolaza	anaerobno dihanje	(+)	
<i>frdB</i>	reduktaza fumarata FeS-proteina	anaerobno dihanje	(-)	
<b>Poti fosfatov pentoze</b>				
<i>tktA</i>	transketolaza I	poti fosfatov pentoze	(-)	
<i>rpe</i>	fosfatribuloza-3-epimeraza	poti fosfatov pentoze	(+)	
<b>Poti glikolize in Entner Doudoroffa</b>				
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	glikoliza tipa I (Etner-Doudoroff)		(+)

**Preglednica 25:** Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu biosinteze aminokislin rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3)

**Table 25:** Temperature dependent changes in metabolism of metabolism of amino acids of recombinant BL21 (DE3) strain.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov kontrolnega seva (primerjava med dvema temperaturama)	
<b>Celična funkcija</b>			C37_25	C42_25
<b>Biosinteza celičnih struktur</b>				
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	biosinteza tvorbe gradnikov kolanske kisline		(+)
<i>rffG</i>	dTDP-glukoza-4,6-dehidrataza 2	biosinteza antigenov enterobakterij	(-)	(-)
<i>glf</i>	UDP-galaktopiranozo mutaza	biosinteza tipa I dTDP-L-ramnoze	(+)	
<i>rfbC</i>	dTDP-4-dehidroramnoza-3,5-epimeraza	biosinteza tipa I dTDP-L-ramnoze	(-)	
<b>Biosinteza aminov in poliaminov</b>				
<i>argI</i>	ornitin karbamoiltransferaza	biosinteza aminopropil kadaverina		(-)
<i>nagB</i>	glukozamin-6-fosfat deaminaza	razgradnja N-acetilglukozamina		(+)
<b>Biosinteza aminokislin</b>				
<i>ydiB</i>	dehidrogenaza kininske/shikiminske kisline	biosinteza triptofana	(-)	
<i>trpC</i>	fosfat-ribozil-antranilat izomeraza/fosfat-indol-3-glicerolsintaza	biosinteza triptofana	(-)	
<i>trpB</i>	triptofan sintaza (dimer $\beta$ -podenote)	biosinteza triptofana	(+)	
<i>ilvI</i>	katalitična podenota acetolaktat sintaze tipa III	biosinteza levcina	(-)	
<i>ilvI</i>	katalitična podenota acetolaktat sintaze tipa III	biosinteza izolevcina	(-)	
<i>ansB</i>	L-asparagin aminohidrolaza tipa II	razgradnja glutamata tipa II	(-)	
<i>ilvI</i>	katalitična podenota acetolaktat sintaze tipa III	biosinteza izolevcina tipa I	(-)	
<i>speE</i>	spermidin sintaza	biosinteza aminopropil kadaverina	(-)	
<i>gcvT</i>	aminometiltransferaza	kompleks razkroja glicina	(-)	
<i>dapE</i>	N-sukcinil-L-diaminopimelat desukcinilaza	biosinteza lizina tipa I	(-)	(-)
<i>proA</i>	5-semialdehid-glutamat dehidrogenaza	biosinteza prolina tipa I		(-)
<i>iscS</i>	cistein desulfuraza	biosinteza alanina tipa I		(+)
<i>cysK</i>	cistein sintaza A	biosinteza cisteina tipa I		(+)

**Preglednica 26:** Temperaturno odvisne spremembe v metabolizmu nukleotidov rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3)

**Table 26:** Temperature dependent changes in metabolism of nucleotides of recombinant BL21 (DE3) strain.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov kontrolnega seva (primerjava med dvema temperaturama)	
<b>Celična funkcija</b>				
<b>Biosinteza nukleozidov in nukleotidov</b>			C37_25	C42_25
<i>pyrE</i>	orotat fosforiboziltransferaza	sprememba ribonukleotidov pirimidina ( <i>de novo</i> biosinteza)	(+) (-)	(+)
<i>deoD</i>	nukleozid-purin fosforilaza (tip deo D)	poti reševanja adenina, hipoksantina in njihovih nukleozidov		(+)
<i>deoD</i>	nukleozid-purin fosforilaza (tip deo D)	poti reševanja gvanina, ksantina in njihovih nukleozidov		(+)
<i>dcd</i>	dCTP-deaminaza	<i>de novo</i> biosinteza deoksiribonukleotidov pirimidina		(-)
<i>trpC</i>	fosfat-indol-3-glicerol sintaza/ fosfat-ribosil-antranilat izomeraza	biosinteza triptofana		(-)
<i>cdd</i>	citidin deaminaza	poti reševanja ribonukleotidov pirimidina	(+)	
<i>udp</i>	uridin fosforilaza	poti reševanja ribonukleotidov pirimidina	(+)	
<b>Razgradnja in recikliranje nukleozidov in nukleotidov</b>				
<i>deoD</i>	nukleozid-purin fosforilaza (tip deoD)	razgradnja deoksiribonukleozidov purina	(+) (+)	(+)
<i>deoD</i>	nukleozid-purin fosforilaza (tip deoD)	razgradnja ribonukleozidov purina		(+)
<i>cdd</i>	citidin deaminaza	razgradnja deoksiribonukleozidov pirimidina		(+)
<i>cdd</i>	citidin deaminaza	razgradnja ribonukleozidov pirimidina		(+)
<i>udp</i>	uridin fosforilaza	razgradnja ribonukleozidov pirimidina	(+)	

**Preglednica 27:** Temperaturno odvisne spremembe v biosintezi kofaktorjev in sekundarnih metabolitov rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3)

**Table 27:** Temperature dependent changes in biosynthesis of cofactors and secondary metabolites of recombinant BL21 (DE3) strain.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov kontrolnega seva (primerjava med dvema temperaturama)			
<b>Celična funkcija</b>						
<b>Razgradnja sekundarnih metabolitov</b>						
<i>idnD</i>	L-idonat 5-dehidrogenaza	razgradnja L-idonata		(-)		
<i>idnO</i>	5-keto-D-glukonat 5-reduktaza	razgradnja L-idonata	(+)	(+)		
<i>garL</i>	$\alpha$ -dehidro- $\beta$ -deoksi-D-glukarat aldolaza	razgradnja D-glukarata in D-galaktarata	(+)			
<i>pfkB</i>	6-fosfofruktokinaza tipa II	razgradnja galaktitolu	(+)			
<i>gatZ</i>	podenota tagatoza-1,6-bifosfat aldolaze 2	razgradnja galaktitolu	(+)			
<i>gatY</i>	podenota tagatoza-1,6-bifosfat aldolaze 2	razgradnja galaktitolu	(+)			
<b>Biosinteza kofaktorjev, zaščitnih skupin in prenašalcev elektronov</b>						
<i>cysG</i>	uroporfirin-C metiltransferaza tipa III	biosinteza sirohema		(+)		
<i>cobC</i>	5'-P-fosfataza predvidenega $\alpha$ -ribazola	reševanje adenozilkobalamina preko kobilamida tipa I	(-)	(-)		
<i>thiC</i>	protein ThiC biosinteze tiamina	biosinteza tiamina tipa I	(-)	(-)		
<i>thiG</i>	tiazol sintaza	biosinteza tiamina tipa I	(-)	(-)		
<i>gshB</i>	glutation sintetaza	biosinteza glutationa		(+)		
<i>ribE</i>	6,7-dimetil-8-ributil-lumazin sintaza	biosinteza flavina tipa I (bakterija)		(+)		
<i>ubiH</i>	2-oktaenil-6-metoksifenol hidroksilaza	biosinteza 8-ubikinina (prokarioti)		(-)		
<i>btuR</i>	kobilamid/kobalamin adenoziltransferaza	reševanje adenozilkobalamina preko kobilamida tipa I	(+)			
<i>cobU</i>	kobilamid-p-gvanililtransferaza/kobilamid kinaza	reševanje adenozilkobalamina preko kobilamida tipa I	(+)			
<i>thiM</i>	hidroksietil-tiazol kinaza	biosinteza tiamina tipa I	(+)			
<i>nadK</i>	NAD-kinaza	NAD-fosforilacija in defosforilacija	(-)			
<i>pdxH</i>	piridoksin-5'-fosfat oksidaza/ piridoksamín 5'-fosfat oksidaza	biosinteza in reševanje piridoksal 5'-fosfata	(+)			
<i>folE</i>	GTP-ciklohidrolaza tipa I	biosinteza tetrahidrofolata	(+)			
<i>folB</i>	dihidroneopterin aldolaza	biosinteza tetrahidrofolata	(+)			
<i>gcvT</i>	aminometiltransferaza	biosinteza THF formila tipa I	(-)			

V preglednicah 28, 29 in 30 so predstavljene primerjave izražanja genov v kontrolnem in produksijskem sevu bakterije *E. coli* pri istih temperaturah (P\_C42 P\_C25, P\_C37). Vsi identificirani statistično značilno različno izraženi geni z negativnim logFC za posamezno primerjavo med sevi so označeni z (-), vsi statistično značilno različno izraženi geni s pozitivnim logFC za posamezno primerjavo med sevi pa s (+).

**Preglednica 28:** Primerjava izražanja genov, ki sodelujejo v energetskih metabolnih poteh bakterije *E. coli* BL21 (DE3) med kontrolnim in produkcijskim sevom pri isti temperaturi

**Table 28:** Comparison of gene expression of genes involved in energetic metabolic pathways in production and control BL21 (DE3) at the same temperature.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov (primerjava med kontrolnim in produkcijskim sevom)
<b>Metabolizem energetskih poti</b>			
<b>Celična funkcija</b>			P_C25      P_C37      P_C42
<b>Metabolizem anorganskih hranil</b>			
<i>ssuD</i>	od FMNH <sub>2</sub> -odvisna alkansulfonatna monooksigenaza	dvokomponentna alkansulfonatna monooksigenaza	(-)      (-)
<b>Biosinteza ogljikovih hidratov</b>			
<i>mngB</i>	$\alpha$ -manozidaza	razgradnja 2-O- $\alpha$ -manozil-D-glicerata	(-)
<i>araB</i>	L-ribulokinaza	razgradnja L-arabinoze	(-)
<i>galM</i>	1-galaktoza epimeraza	razgradnja galaktoze tipa I (metabolna pot Leloirja)	(+)
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	glukoneogeneza tipa I	(-)
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	glukoneogeneza tipa I	(-)
<b>Fermentacija</b>			
<i>acnB</i>	2-metilizocitrat dehidrataza	cikel 2-metilcitrata tipa I	(+)
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	anaerobna fermentacija (laktat, acetat in format)	(-)
<b>Poti fosfatov pentoze</b>			
<i>rpe</i>	fosfatribuloza-3-epimeraza	poti fosfatov pentoze	(-)
<i>tktA</i>	transketolaza tipa I	poti fosfatov pentoze	(+)
<i>talA</i>	transaldolaza A	poti fosfatov pentoze (oksidativna pot)	(-)
<i>gnd</i>	6-fosfoglukonat dehidrogenaza (dekarboksilacija)	poti fosfatov pentoze (oksidativna pot)	(+)
<b>Biosinteza maščobnih kislin in lipidov</b>			
<i>cfa</i>	sintaza fosfolipidne ciklopropanske acilmaščobne kisline	biosinteza ciklopropanskih maščobnih kislin (CFA)	(-)
<b>Dihanje</b>			
<i>mdh</i>	akonitat hidrataza 2 (dvojna funkcija delovanja)	anaerobno dihanje	(-)
<i>acnB</i>	malat dehidrogenaza	anaerobno dihanje	(+)
<b>Glikoliza</b>			
<i>mdh</i>	malat dehidrogenaza	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)	(-)
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)	(-)
<i>acnB</i>	2-metilizocitrat dehidrataza	izogib sinteze CO <sub>2</sub> in TCA (Krebsov cikel)	(+)
<b>Poti glikolize in Entner Doudoroff-a</b>			
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	glikoliza tipa I (Entner-Doudoroff)	(-)
<b>Razgradnja ogljikovih hidratov</b>			
<i>rpb</i>	alozo-6-fosfat izomeraza/riboza-5-fosfat izomeraza B	razgradnja D-aloze	(+)

**Preglednica 29:** Primerjava izražanja genov, ki sodelujejo v metabolnih poteh biosinteze aminokislin bakterije *E. coli* BL21 (DE3) med kontrolnim in produksijskim sevom pri isti temperaturi

**Table 29:** Comparison of gene expression of genes involved in metabolic pathways of amino acid biosynthesis in production and control BL21 (DE3) at the same temperature.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov (primerjava med kontrolnim in produksijskim sevom)		
<i>Biosinteza aminokislin</i>			P_C25	P_C37	P_C42
<i>Celična funkcija</i>					
<i>Biosinteza aminokislin</i>					
<i>ydiB</i>	dehidrogenaza kinijске/shikimijiske kisline	biosinteza triptofana	(-)	(-)	(-)
<i>trpC</i>	fosfat-ribozil-antralinat-izomeraza/ fosfat-indol-3-glicerol-sintaza	biosinteza triptofana	(-)		
<i>dapE</i>	N-sukcinil-L-diaminopimelat desukcinilaza	biosinteza lizina tipa I		(+)	
<i>gcvT</i>	aminometiltransferaza	kompleks razgradnje glicina			(-)
<i>cysK</i>	cistein sintaza A	biosinteza cisteina tipa I			(-)
<i>proA</i>	5-semialdehid-glutamat dehidrogenaza	biosinteza proлина tipa I			(+)
<i>iscS</i>	cistein desulfuraza	biosinteza alanina tipa I			(-)
<i>dapA</i>	dihidropipikolinat sintaza	biosinteza aspartata			(-)
<i>Razgradnja aminokislin</i>					
<i>cysK</i>	cistein sintaza A	razgradnja L-cisteina tipa II			(-)
<i>Biosinteza celičnih struktur</i>					
<i>pgi</i>	glukoza-fosfat izomeraza	biosinteza tvorbe gradnikov kolanske kisline			(-)
<i>glf</i>	UDP-galaktosidna mutaza	biosinteza tvorbe gradnikov antigena O			(+)

**Preglednica 30:** Primerjava izražanja genov, ki sodelujejo v metabolnih poteh biosinteze kofaktorjev in sekundarnih metabolitov bakterije *E. coli* BL21 (DE3) med kontrolnim in producijskim sevom pri isti temperaturi (nadaljevanje)

**Table 30:** Comparison of gene expression of genes involved in metabolic pathways of biosynthesis of cofactors and secondary metabolites in production and control BL21 (DE3) at the same temperature.

Gen	Funkcija proteina	Metabolna pot	Razlike v izražanju genov (primerjava med kontrolnim in producijskim sevom)		
<i>Biosinteza kofaktorjev in sekundarnih metabolitov</i>			P_C25	P_C37	P_C42
<i>Celična funkcija</i>					
<i>Razgradnja sekundarnih metabolitov</i>					
<i>gatY</i>	podenota tagatoza-1,6-bifosfat aldolaze 2	razgradnja galaktitola	(+)	(-)	
<i>gatZ</i>	podenota tagatoza-1,6-bifosfat aldolaze 2	razgradnja galaktitola		(-)	
<i>idnD</i>	L-idonat 5-dehidrogenaza	razgradnja L-idonata		(+)	
<i>yjjN</i>	predvidena L-galaktonat oksidoreduktaza	razgradnja L-galaktonata			(+)
<i>uxaB</i>	altronat oksidoreduktaza	razgradnja D-galakturonata tipa I			(+)
<i>Biosinteza kofaktorjev, zaščitnih skupin in prenosalcev elektronov</i>					
<i>cobU</i>	p-gvanilil-kobinamid transferaza/kobinamid kinaza	reševanje adenozilkobalamina preko kobinamida tipa I	(+)		
<i>thiC</i>	protein biosinteze tiamina ThiC	biosinteza tiamina tipa I	(-)		
<i>cobC</i>	5'-P-fosfataza predvidenega $\alpha$ -ribazola	reševanje adenozilkobalamina preko kobinamida tipa I		(+)	
<i>thiG</i>	tiazol sintaza	biosinteza tiamina tipa I	(-)		
<i>gcvT</i>	aminometiltransferaza	biosinteza formila THF tipa I			(-)
<i>frmA</i>	formaldehid dehidrogenaza odvisna od glutationa	oksidacija formaldehida tipa II (odvisna od glutationa)		(+)	
<i>pdxH</i>	piridoksin-5'-fosfat oksidaza/piridoksam-5'-fosfat oksidaza	biosinteza in reševanje piridoksal 5'-fosfata		(-)	
<i>cysG</i>	uroporfirin-C metltransferaza tipa III	biosinteza sirohema			(-)
<i>btuR</i>	kobinamid/kobinamin adenoziltansferaza	reševanje adenozilkobalamina s pomočjo kobinamida tipa I			(+)
<i>cobS</i>	5'-fosfat- kobalamin sintaza/kobalamin sintazaa	reševanje adenozilkobalamina s pomočjo kobinamida tipa I			(+)
<i>thiM</i>	hidroksi-etil-tiazol kinaza	biosinteza tiamina tipa I			(+)
<i>gshB</i>	glutation sintetaza	biosinteza glutationa			(-)
<i>ribE</i>	6,7-dimetil-8-ribitol lumazin sintaza	biosinteza flavina tipa I (bakterija)			(-)
<i>ribF</i>	bifunkcionalna riboflavin kinaza /FMN-adeniltransferaza	biosinteza flavina tipa I (bakterijska)			(+)

#### **4.6.2 Temperaturno odvisne spremembe v ravneh izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s temperaturnim stresom povezane proteine**

Potem smo se osredotočili na analizo izražanja genov, ki nosijo zapis za proteaze in šaperone. Najprej smo primerjavo izvedli za izražanje posameznega gena (ki nosi zapis za proteazo oz. šaperon in ostale s stresom povezane proteine) pri temperaturi 37 °C in 42 °C glede na izražanje istega gena pri temperaturi 25 °C, za oba, produkcijski in kontrolni sev (preglednica 31). Nato pa smo primerjavo izvedli še za izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine med kontrolnim in produkcijskim sevom pri isti temperaturi (preglednica 32).

Vse dobljene rezultate statistično značilno različno izraženih genov ( $p > 0,05$ ) ob upoštevanju absolutne razlike v izražanju ( $-0,5 > \log FC > 0,5$ ), ki nosijo zapis za pomembnejše proteaze in šaperone ter ostale faktorje hsr, smo povzeli v preglednicah 31 in 32.

Ob upoštevanju podatkovnih zbirk EcoCyc, KEGG in večine člankov, navedenih v poglavju Literatura (Chuang in Blattner, 1993; Gottesman, 1996; Guisbert in sod., 2004; Arifuzzaman in sod., 2006 ter Vanz in sod., 2008...), smo ugotovili, da smo uspeli spremljati izražanje kar 131 genov, ki nosijo zapis za do zdaj poznane molekulske šaperone, proteaze, faktorje sigma in ostale proteine, povezane z nastankom odziva hsr pri bakteriji *E. coli*. Med temi 131 geni je bilo 26 (20 %) takih genov, ki so se jih ravni izražanja značilno spremenile ( $\geq 1,5X$ ), od tega so bile višje ravni izražanja vidne pri 14 genih (+), nižje ravni izražanja pa pri 17 genih (-) (preglednici 31 in 32) (nekateri isti geni so imeli pri različnih primerjavah sevov in temperaturah značilno različna izražanja).

Pri pregledu genov, kjer so bile vidne višje ravni izražanja, smo določili skoraj 70 % (tj. 9) takih, ki nosijo zapis za molekulske šaperone in ostale s temperaturnim stresom povezane proteine, dva, ki nosita zapis za proteaze v citoplazemski membrani, in tri, ki nosijo zapis za periplazemske proteaze. Pri pregledu genov, kjer so bile vidne nižje ravni izražanja, je bilo 11 takih, ki nosijo zapis za molekulske šaperone in ostale s temperaturnim stresom povezane proteine, dva nosita zapis za faktorje sigma in regulatorje, en pa zapis za citoplazemske proteaze, dva nosita zapis za proteaze v citoplazmi in en zapis za periplazemske proteaze.

Ko smo rezultate pogledali podrobneje (preglednica 31), smo ugotovili, da so bile pri primerjavi med 37 °C in 25 °C vidne višje ravni izražanja le pri enem genu (samo v primeru kontrolnega seva), pri 9 genih pa so bile vidne nižje ravni izražanja (od tega en gen v produkcijskem sevu in 8 genov v kontrolnem sevu). Pri primerjavi med 42 °C in 25 °C, kjer smo tudi dobili najizrazitejše spremembe, so bile vidne višje ravni izražanja pri 7 genih (od

tega trije geni v produksijskem sevu in 5 genov v kontrolnem sevu), pri 7 genih pa so bile vidne nižje ravni izražanja (od tega en gen v produksijskem sevu in 6 genov v kontrolnem sevu) (nekateri isti geni so imeli pri različnih primerjavah sevov in temperaturah značilno različna izražanja). Pri primerjavi rezultatov izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine med kontrolnim in produksijskim sevom pri isti temperaturi (preglednica 32), smo ugotovili, da je do največjih razlik v izražanju prišlo pri 42 °C, medtem, ko pri 37 °C teh razlik ni bilo. Ugotovili smo, da so bile pri 42 °C vidne spremembe v ravni izražanja pri 9 genih (pri 5 genih so bile vidne višje ravni izražanja, pri 4 pa nižje ravni izražanja). Pri 25 °C so bile spremembe v ravneh izražanja vidne pri 4 genih (pri dveh genih sta bili vidni višji ravni izražanja, pri ostalih dveh pa nižji ravni izražanja).

**Preglednica 31:** Temperaturno odvisne spremembe v izražanju genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3)

**Table 31:** Temperature dependent changes in gene expression of chaperones, proteases and other heat shock and stress induced proteins in recombinant *E. coli* BL21 (DE3) strain.

ID-številka EcoCyc	Gen	Funkcija proteina	Razlike v izražanju genov kontrolnega in produksijskega seva (primerjava med dvema temperaturama)			
			P37_25	P42_25	C37_25	C42_25
<b>Najbolj preučevani šaperoni in ostali s stresom povezani proteini</b>						
EG10599	<i>groEL</i>	šaperon		(+)		(+)
EG10241	<i>dnaK</i>	šaperon				(+)
EG10240	<i>dnaJ</i>	šaperon		(+)		
EG11534	<i>ibpA</i>	šaperon				(+)
G6463	<i>clpS</i>	šaperon			(-)	
EG12194	<i>ccmE</i>	šaperon				(-)
EG11973	<i>ecpD</i>	šaperon			(-)	
G378	<i>fliJ</i>	šaperon (potencialno)			(-)	
EG11976	<i>fliQ</i>	biosinteza flagelov			(-)	(-)
G7039	<i>fliY</i>	cistein vezavni protein				(-)
EG12195	<i>torD</i>	Šaperon			(-)	
EG11877	<i>uspD</i>	protein stresa				(+)
EG11246	<i>uspE</i>	protein stresa			(-)	
G7743	<i>hslR</i>	protein temperaturnega stresa				(-)
<b>Citoplazemske proteaze</b>						
G6991	<i>yeaZ</i>	hipotetična proteaza			(-)	
<b>Proteaze citoplazemske membrane</b>						
EG10397	<i>glpG</i>	GlpG (Ser-proteaza notranje membrane)			(+)	
EG10956	<i>sohB</i>	potencialna Ser- proteaza SohB			(-)	(-)
EG12436	<i>yaeL</i>	Zn-proteaza RseP	(-)	(-)		
<b>Periplazemske proteaze</b>						
EG11893	<i>dacD</i>	PBP-6B, D-alanil-D- alanin karboksipeptidaza				(-)
EG10463	<i>degP</i>	Ser-proteaza Do				(+)
G6746	<i>ydcP</i>	domnevna proteaza YdcP		(+)		

V preglednici 31 so predstavljene primerjave izražanja genov v kontrolnem in producijskem sevu bakterije *E. coli* pri različnih temperaturah (P37\_25, P42\_25, C42\_25, C37\_25). Vsi identificirani statistično značilno različno izraženi geni z negativnim logFC za posamezno primerjavo med temperaturami so označeni z (-), vsi statistično značilno različno izraženi geni s pozitivnim logFC za posamezno primerjavo med temperaturami pa s (+).

**Preglednica 32:** Primerjava izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine rekombinantnega seva bakterije *E. coli* BL21 (DE3) med kontrolnim in producijskim sevom pri isti temperaturi

**Table 32:** Comparison of gene expression of proteases, chaperones and stress induced proteins in production and control BL21 (DE3) strain at the same temperature.

ID-številka EcoCyc	Gen	Funkcija proteina	Razlike v izražanju genov (primerjava med kontrolnim in producijskim sevom)		
			P_C25	P_C37	P_C42
<b>Faktorji sigma in regulatorji</b>					
EG10897	<i>rpoH</i> ( $\sigma^{32}$ )	faktor sigma, ki nadzira odziv na temperturni stres			(-)
EG12121	<i>rssB</i>	sigma regulator			(-)
<b>Šaperoni in ostali s stresom inducirani proteini</b>					
G7039	<i>fliY</i>	cistein vezavni protein			(+)
G7055	<i>hchA</i>	šaperon			(+)
G6357	<i>hscC</i>	šaperon			(+)
EG11877	<i>uspD</i>	protein stresa			(-)
G6939	<i>spy</i>	protein stresa			(-)
EG11246	<i>uspE</i>	protein stresa			(+)
<b>Citoplazemske proteaze</b>					
G6991	<i>yeaZ</i>	hipotetična proteaza	(-)		
<b>Proteaze citoplazemske membrane</b>					
EG12436	<i>yaeL</i>	Zn-proteaza RseP	(+)		
EG10956	<i>sohB</i>	potencialna Ser-proteaza SohB	(-)		
<b>Periplazemske proteaze</b>					
EG11893	<i>dacD</i>	PBP-6B, D-alanil-D-alanin karboksipeptidaza			(+)

V preglednici 32 so predstavljene primerjave izražanja genov v kontrolnem in producijskem sevu bakterije *E. coli* pri različnih temperaturah (P\_C25, P\_C37, P\_C42). Vsi identificirani statistično značilno različno izraženi geni z negativnim logFC za posamezno primerjavo med temperaturami so označeni z (-), vsi statistično značilno različno izraženi geni s pozitivnim logFC za posamezno primerjavo med temperaturami pa s (+).

#### 4.7 POTRDITEV REZULTATOV MIKROMREŽNIH ANALIZ S PCR V REALNEM ČASU

S hibridizacijami mikromrež smo želeli dobiti čim širši pregled nad spremembami v ravneh izražanja genov bakterije *Escherichia coli* BL21, ki kodirajo predvsem šaperone in proteaze ter ostale proteine, ki sodelujejo pri odgovoru na stres. Ustreznost dobljenih rezultatov smo želeli potrditi še z analizo qPCR. Kot smo že razložili v tretjem poglavju, smo po statistični obdelavi podatkov, dobljenih iz rezultatov hibridizacij mikromrež, izbrali 6 genov (skušali smo izbrati predvsem kandidate med šaperoni in proteazami), ki smo jih preverili z metodo PCR v realnem času (qPCR).

Izbrali smo naslednje gene: *yeaz*, *ydcp*, *groEL*, *ecpd*, *tord* in *uspd(yiit)*. Vsi našteti geni so bili izbrani ob upoštevanju njihove funkcije delovanja (preglednica 11) in na podlagi upoštevanja intenzitete emitirane fluorescence, dobljene pri hibridizacijah mikromrež. Pri tem smo upoštevali rezultate, pridobljene iz statistične obdelave podatkov, tako da smo med seboj primerjali spremembe v ravni izražanja genov pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C, in to v primeru produkcijskega in kontrolnega seva.

Vsi rezultati analiz qPCR so predstavljeni v preglednici 33. V prvi vrstici je za vsak gen najprej podan rezultat spremembe v ravni izražanja, dobljen s hibridizacijo mikromrež, v drugi vrstici pa je podan rezultat, dobljen z metodo qPCR. Spremembe v ravneh izražanja (izražene v log2 razmerjih – logFC) so podane primerjalno med različnima temperaturama glede na produkcijski in kontrolni sev.

Primerjave temperatur so podane kot sledi. P37\_25 pomeni, da so med seboj primerjani rezultati dobljeni po hibridizaciji (oz. analizi qPCR) produkcijskega seva pri 37 °C glede na 25 °C, P42\_25 pomeni, da so med seboj primerjani rezultati dobljeni po hibridizaciji (oz. analizi qPCR) produkcijskega seva pri 42 °C glede na 25 °C, C37\_25 pa, da so med seboj primerjani rezultati dobljeni po hibridizaciji (oz. analizi qPCR) kontrolnega seva pri 37 °C glede na 25 °C. C42\_25 pomeni, da so med seboj primerjani rezultati dobljeni po hibridizaciji (oz. analizi qPCR) kontrolnega seva bakterije *E. coli* BL21 pri 42 °C glede na 25 °C. P\_C25, P\_C37, P\_C42 označujejo primerjave izražanja genov v kontrolnem in produkcijskem sevu bakterije *E. coli* pri različnih temperaturah.

**Preglednica 33:** Primerjava meritev izražanja genov z mikromrežami in kvantitativnim PCR v realnem času

**Table 33:** Comparison of gene expression measurements by microarrays and quantitative real-time PCR.

Gen	Metoda	P37_25	P42_25	C37_25	C42_25	P_C25	P_C37	P_C42
<i>groEL</i>	M	NS	<b>0,7</b>	NS	<b>1,7</b>	NS	NS	NS
	qPCR		<b>1,6</b>	-0,7	<b>1,1</b>			
<i>ecpD</i>	M	NS	NS	<b>-1,2</b>	NS	NS	NS	NS
	qPCR			<b>-0,7</b>				
<i>torD</i>	M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	qPCR							
<i>uspD</i>	M	NS	<b>1,1</b>	NS	<b>2,5</b>	NS	NS	<b>-1,4</b>
	qPCR		<b>1,6</b>		<b>1,0</b>			
<i>yeaZ</i>	M	NS	NS	<b>-2,2</b>	NS	<b>-1,6</b>	NS	NS
	qPCR			<b>-0,9</b>		<b>-1,4</b>		
<i>ydcP</i>	M	NS	<b>1,6</b>	NS	NS	NS	NS	NS
	qPCR		<b>0,9</b>					

V preglednici 33 so predstavljene vrednosti logFC. Statistično značilno različne vrednosti so označene odbeljeno. Statistično neznačilne različne vrednosti izražanja, dobljene s hibridizacijo mikromrež, so označene z NS (angl. *not significant*).

Iz rezultatov (preglednica 33) smo ugotovili, da so spremembe v ravneh izražanja genov v primeru rezultatov, dobljenih z analizo qPCR, podobne tistim, dobljenim s hibridizacijami mikromrež, za vse gene znotraj posameznega temperaturnega segmenta, tj. v primeru 37 °C in 42 °C glede na 25 °C, tako za produkcijski kot za kontrolni sev. Ugotovili smo tudi, da rezultati, dobljeni s qPCR pri 37 °C glede na 25 °C (v primeru produkcijskega seva), potrjujejo statistično neznačilne različne vrednosti, dobljene s hibridizacijo mikromrež, prav za vse gene. Po drugi strani so bili rezultati, dobljeni z analizo qPCR pri 37 °C glede na 25 °C (v primeru kontrolnega seva), podobni tistim, dobljenim s hibridizacijo mikromrež (razlika je bila le pri genu *groEL*, kjer smo imeli statistično neznačilno različno vrednost izražanja v primeru hibridizacije mikromrež). Iz rezultatov, dobljenih z analizo qPCR za spremembe v ravneh izražanja pri 42 °C glede na 25 °C (tako v primeru produkcijskega seva kot tudi v primeru kontrolnega seva), je bilo za vse gene razvidno, da so rezultati izražanja, dobljeni s hibridizacijo mikromrež, podobni. Pri primerjavi kontrolnega in produkcijskega seva pri posameznih temperaturah smo pri vseh genih opazili podoben trend izražanja.

Ob primerjavi rezultatov (preglednica 3) smo ugotovili, da smo statistično značilno razliko rezultatov, dobljenih z mikromrežami, skoraj v celoti potrdili s statistično značilno razliko

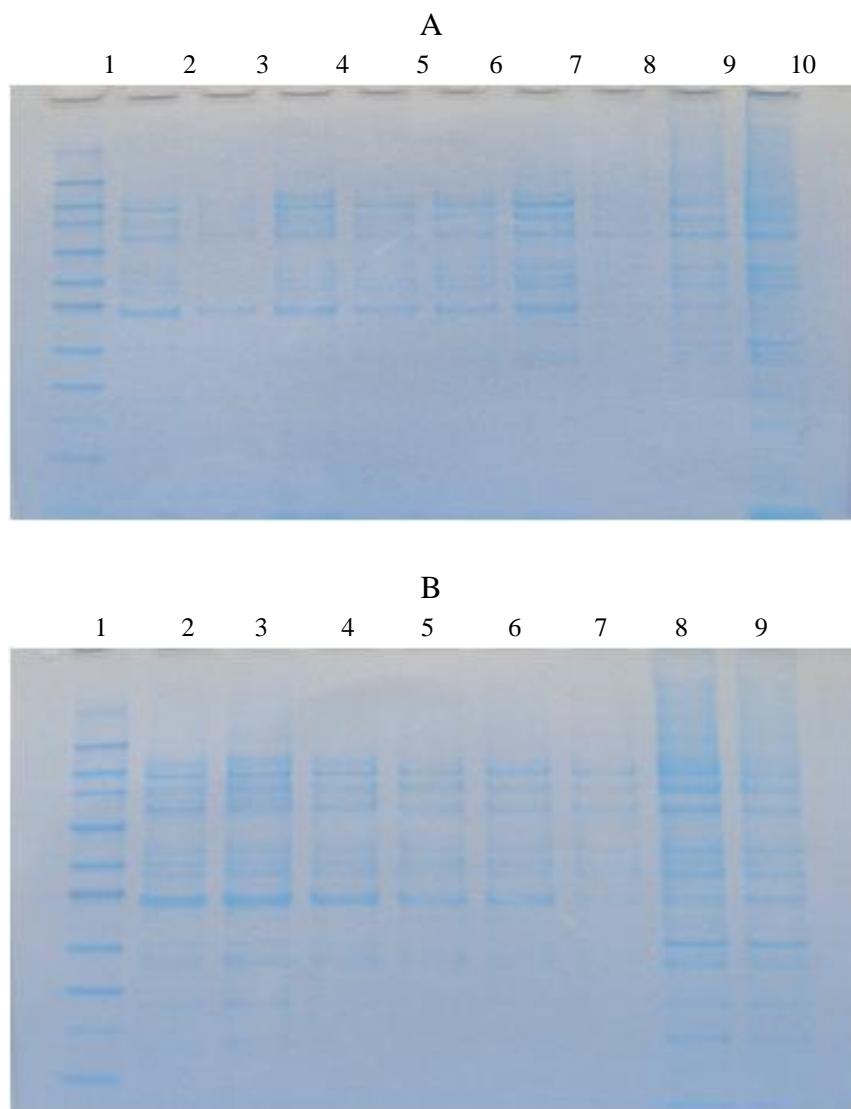
rezultatov, dobljenih z analizo qPCR. Kjer tega nismo uspeli potrditi, pa smo opazili podoben trend izražanja genov.

#### 4.8 SPREMENBA RAVNI IZLOČANJA PROTEINA GroEL

##### 4.8.1 ANALIZA PROTEINOV – PRENOS WESTERN

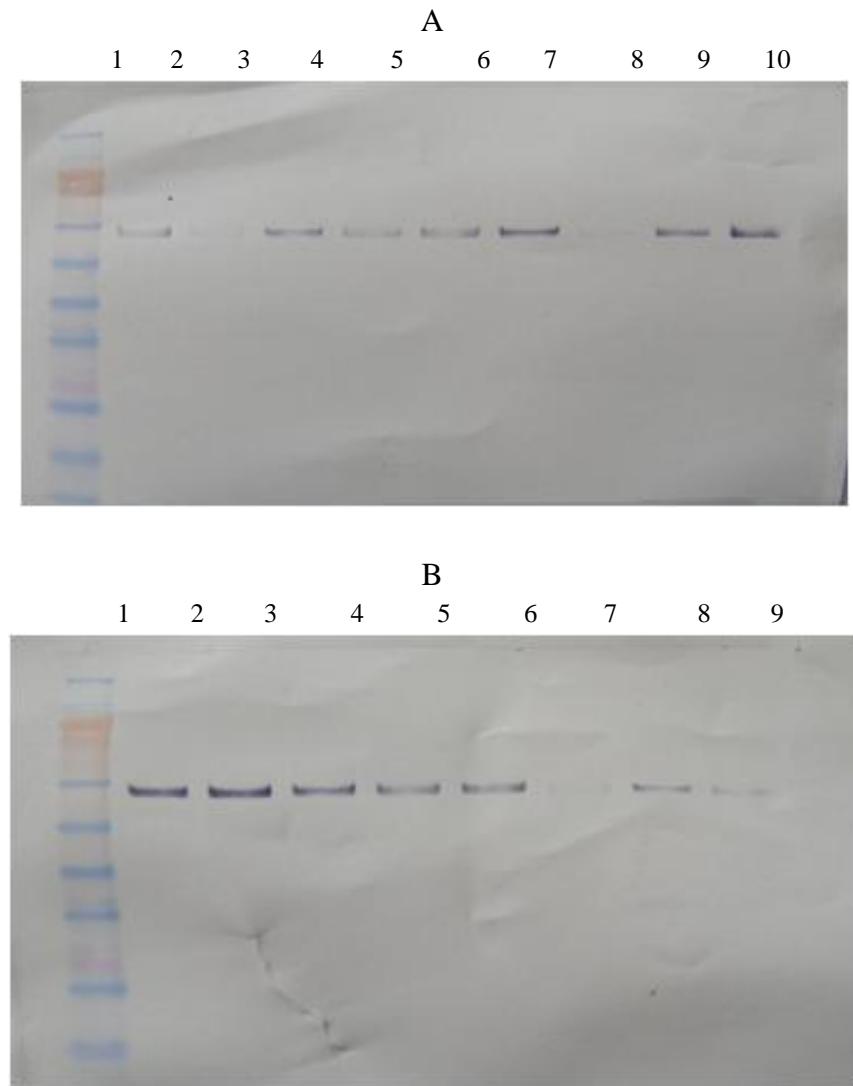
S hibridizacijami mikromrež smo dobili rezultate sprememb v ravneh izražanja različnih genov, ki kodirajo šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine. Med temi geni smo jih izbrali 6, katerih rezultate smo potrdili še z analizo qPCR. V nadaljevanju smo želeli potrditi spremembe v izražanju ravni izbranih genov tudi na proteinski ravni. To smo izvedli z analizo proteinov s prenosom Western (WB), kjer smo za vsak izbrani protein določili njegove ravni izločanja, tako da smo uporabili specifična protitelesa. V okviru izbora seta genov smo na trgu uspeli dobiti specifično protitelo le za šaperon GroEL, za ostalih 5 pa nam ni uspelo dobiti specifičnih protiteles. Postopek priprave raztopine protiteles in vzorcev ter sam potek analize je opisan v poglavju 3.12. Z analizo proteinov na elektroforezi NaDS-PAGE smo najprej poskušali oceniti celotno koncentracijo proteinov *E. coli*, nato pa z imunskim prenosom Western čim bolj natančno oceniti koncentracijo proteina GroEL in s tem oceniti spremembe v ravni izločanja.

Iz rezultatov prenosa Western; tj. po pregledu gelov, dobljenih z elektroforezo NaDS-PAGE, in membran, dobljenih po detekciji s specifičnimi protitelesi, smo ocenili, da imamo v primeru izločanja proteina GroEL pri 37 °C ali pri 42 °C glede na 25 °C (za produkcijski in kontrolni sev) višje ravni proteina (slika 25), kar je bilo v skladu s predhodno potrjenimi rezultati za gen *groEL*, ki nosi zapis za šaperon GroEL, dobljenimi s hibridizacijami mikromrež ter z analizo qPCR.



**Slika 24:** Rezultat elektroforez NaDS-PAGE celotnih proteinov *E. coli* BL21; 1) standard, 2) P42-1, 3) P42-2, 4) P42-3, 5) P37-1, 6) P37-2, 7) P37-3, 8) P25-1, 9) P25-2, 10) P25-3 (A) in (B) 1) standard, 2) C42-1, 3) C42-2, 4) C42-3, 5) C37-1, 6) C37-2, 7) C37-3, 8) C25-1, 9) C25-2

**Figure 24:** SDS – PAGE of total *E. coli* proteins; 1) Standard, 2) P42-1, 3) P42-2, 4) P42-3, 5) P37-1, 6) P37-2, 7) P37-3, 8) P25-1, 9) P25-2, 10) P25-3 (A) in (B) 1) Standard, 2) C42-1, 3) C42-2, 4) C42-3, 5) C37-1, 6) C37-2, 7) C37-3, 8) C25-1, 9) C25-2.



**Slika 25:** Določevanje proteina GroEL po prenosu WB; 1) Standard, 2) P42-1, 3) P42-2, 4) P42-3, 5) P37-1, 6) P37-2, 7) P37-3, 8) P25-1, 9) P25-2, 10) P25-3 (A) in (B) 1) Standard, 2) C42-1, 3) C42-2, 4) C42-3, 5) C37-1, 6) C37-2, 7) C37-3, 8) C25-1, 9) C25-2

**Figure 25:** WB of GroEL; 1) Standard, 2) P42-1, 3) P42-2, 4) P42-3, 5) P37-1, 6) P37-2, 7) P37-3, 8) P25-1, 9) P25-2, 10) P25-3 (A) in (B) 1) Standard, 2) C42-1, 3) C42-2, 4) C42-3, 5) C37-1, 6) C37-2, 7) C37-3, 8) C25-1, 9) C25-2.

Gela, dobljena z elektroforezo NaDS-PAGE, ter membrani, dobljeni po detekciji s specifičnimi protitelesi, smo nato analizirali s prosto dostopnim programom ImageJ, kot smo opisali v poglavju 3.13.

#### **4.8.2 DENZITOMETRIČNA ANALIZA GELOV IN MEMBRAN S PROGRAMOM ImageJ**

S programom ImageJ smo semikvantitativno ocenili količino celotnih proteinov *E. coli* BL21 na gelih, dobljenih z elektroforezo NaDS-PAGE, ter količino proteina GroEL na membranah, dobljenih po WB. Pri tem smo ugotovili, da rezultati WB izbranega proteina GroEL potrjujejo rezultate hibridizacij mikromrež in qPCR izbranega gena *groEL* pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C v obeh primerih; tj. v primeru produkcijskega in kontrolnega seva, kjer smo pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C pridobili več proteina GroEL (preglednici 34 in 35).

**Preglednica 34:** Prikaz ocene sprememb v koncentraciji proteina GroEL glede na koncentracijo celotnih proteinov seva BL21 bakterije *E. coli* za produkcijski sev pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C (pomen oznak vzorcev je opisan v poglavju 4.2 v preglednici 18 in v poglavju 4.6)

**Table 34:** GroEL expression levels for production strain at T = 37°C and 42°C with regard to 25°C (sample labeling is described in Chapter 4.2 in Table 18 and in Chapter 4.6).

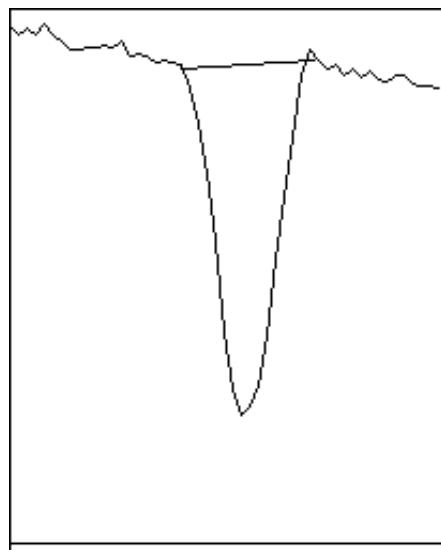
Oznaka vzorca	Relativna koncentracija	Površina (NaDS-PAGE)	Površina (WB)	Relativna koncentracija	Povprečna relativna koncentracija	Razmerje log <sub>2</sub>
P42-1	1,250	1930	20,8	0,0134		
P42-2	1,250	1564	1,4	0,0011	0,0116	<b>P42_25</b>
P42-3	1,250	1682	27,3	0,0203		<b>0,697</b>
P37-1	1,250	2029	14,1	0,0087		
P37-2	1,250	1459	23,7	0,0203	0,0229	<b>P37_25</b>
P37-3	1,250	1359	43,1	0,0397		<b>1,675</b>
P25-1	0,375	1618	2,0	0,0005		
P25-2	0,375	1439	27,5	0,0072	0,0072	
P25-3	0,375	1140	42,1	0,0139		

**Preglednica 35:** Prikaz ocene sprememb v koncentraciji pridobljenega proteina GroEL glede na koncentracijo celotnih proteinov seva BL21 bakterije *E. coli* za kontrolni sev pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C (pomen oznak vzorcev je opisan v poglavju 4.2 v preglednici 18)

**Table 35:** GroEL expression levels for control strain at T = 37°C and 42°C with regard to 25°C (sample labeling is described in Chapter 4.2 in Table 18).

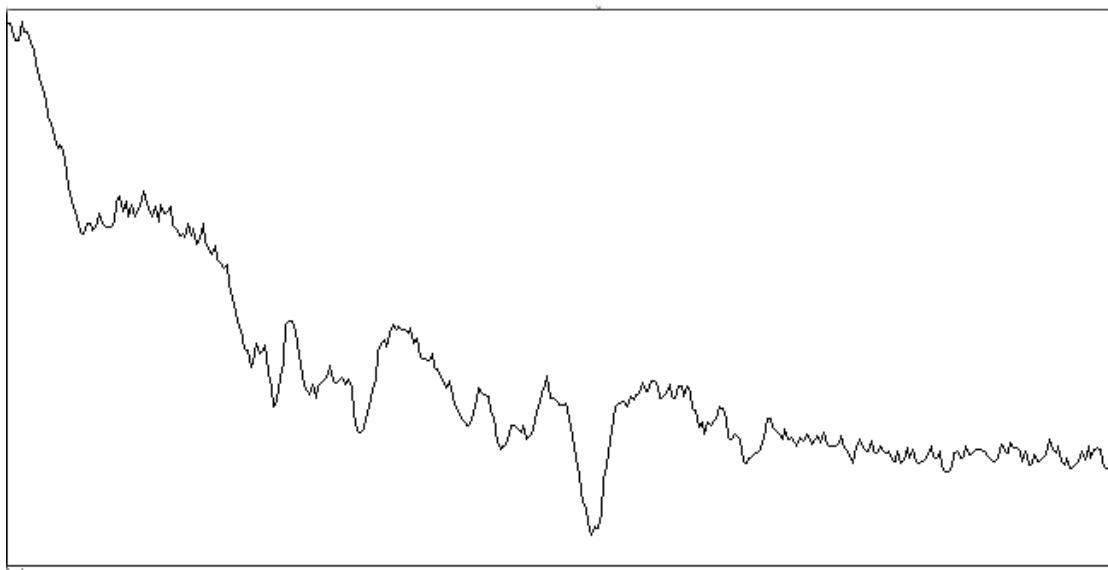
Oznaka vzorca	Relativna koncentracija	Površina (NaDS-PAGE)	Površina (WB)	Relativna koncentracija	Povprečna relativna koncentracija	Razmerje log <sub>2</sub>
C42-1	1,250	2074	67,6	0,0401		
C42-2	1,250	2056	80,1	0,0487	0,0410	<b>C42_25</b>
C42-3	1,250	2027	55,4	0,0342		<b>2,533</b>
C37-1	1,250	1087	35,1	0,0404		
C37-2	1,250	1109	45,9	0,0517	0,0312	<b>C37_25</b>
C37-3	1,250	1216	1,4	0,0015		<b>2,139</b>
C25-1	0,375	749	20,8	0,0104	0,0071	
C25-2	0,375	934	9,4	0,0038		

Rezultati (preglednici 34 in 35) so prikazani kot razmerja log<sub>2</sub> relativne koncentracije proteina GroEL pri različnih temperaturah. Relativno koncentracijo proteina GroEL smo izračunali glede na razmerje površine intenzivnosti lise na membrani, dobljeni po WB, posameznega vzorca in površine intenzivnosti vseh lis celotnih proteinov *E. coli* BL21 na gelu, dobljenem z elektroforezo NaDS-PAGE posameznega vzorca (pri tem smo v izračunu upoštevali tudi znane začetne relativne koncentracije celotnih proteinov *E. coli* BL21) (sliki 26 in 27).



**Slika 26:** Prikaz integracije intenzivnosti lise na membrani, dobljeni po imunskem prenosu WB, proteina GroEL posameznega vzorca s programom ImageJ.

**Figure 26:** Representative integration of GroEL with ImageJ.



**Slika 27:** Prikaz intenzivnosti vseh lis celokupnih proteinov *E. coli* BL21 na gelu, dobljenem z elektroforezo NaDS-PAGE posameznega vzorca s programom ImageJ.

**Figure 27:** Representative integration of total *E. coli* proteins with ImageJ.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Rast kontrolnih in produkcijskih sevov

Rast produkcijskih in kontrolnih sevov bakterije *E. coli* BL21 (slika 16) je bila v skladu s predhodno dobljenimi rezultati sodelavcev (Jevševar, 2007; Škulj in sod., 2008), ki so pri posameznih temperaturah rasti omenjenih sevov določili ustrezeno optične gostote ( $OD_{600}$ ), ko je bila dosežena točka prehoda iz logaritemske v stacionarno fazo rasti bakterije *E. coli*. Po doseženi ustrezeni  $OD_{600}$  smo spektrofotometrično, z aparatom NanoDrop, določili koncentracije RNA. Pri tem smo dobili koncentracije izolirane RNA (preglednica 18), katerih vrednosti so bile med 800 in 2300 ng/ $\mu$ L. Pri določanju koncentracije RNA pri 25 °C smo uporabili približno eno petino usedline glede na količino usedline, ki smo jo uporabili pri 37 °C ali pri 42 °C.

#### 5.1.2 Primerjava genomov sevov BL21 IN K-12 bakterije *E. Coli*

Kot je ugotovil že Schneider s sod. (2002), seva BL21 in K-12 bakterije *E. coli* izkazujeta več kot 98-odstotno identičnost v nukleotidnih zaporedjih, kar smo potrdili tudi pri primerjavi le-teh z javno dostopno podatkovno zbirko NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 15.2.2010). Ob upoštevanju ugotovitev Schneiderja in sod. (2002) ter naših hibridizacijskih rezultatov smo sklenili, da so mikromreže podjetja CombiMatrix (CombiMatrix CustomArray™ 12K, 2010) primerne za hibridizacijo produkcijskega in kontrolnega seva BL21 bakterije *E. coli*.

#### 5.1.3 Pregled razlik v izražanju posameznih genov, prisotnih v metabolnih poteh bakterije *E. coli*

Da bi zmanjšali nastajanje neželenih metabolitov in povečali produkcijo rekombinantnih proteinov, pri gojenju bakterije *E. coli* pogosto uporablajo faktor spremembe temperature (Gadgil in sod., 2005). To povzroči spremembe, ki vplivajo na metabolne poti bakterije *E. coli*. Med najpomembnejšimi razlikami, o katerih so do zdaj že poročali Polissi in sod. (2003), Gadgil in sod. (2005) ter White-Ziegler in Davis (2009), so spremembe v izražanju genov, ki sodelujejo v metabolizmu energetskih poti, biosintezi aminokislin, kofaktorjev in sekundarnih metabolitov ter v signalnih poteh. Za sev BL21 bakterije *E. coli* smo dobili podobne rezultate. Če smo primerjali produkcijski in kontrolni sev pri različnih temperaturah, smo iz rezultatov, ki smo jih predstavili v preglednicah od 22 do 29, ugotovili, da smo uspeli s hibridizacijami

identificirati povprečno kar 44 % takih genov, ki so opisani v diagramu metabolnih poti bakterije *E. coli*. Če smo primerjali kontrolni in produkcijski sev pri isti temperaturi, pa smo s hibridizacijami identificirali kar 45 % takih, ki smo jih našli v diagramu metabolnih poti bakterije *E. coli*. S tem smo potrdili, da zaradi vpliva temperature nastajajo razlike v izražanju genov, ki sodelujejo v metabolnih poteh bakterije *E. coli*.

#### 5.1.3.1 Pri zvišani temperaturi gojenja kontrolnega seva bakterije *E. coli* geni z zapisom za proteine, ki sodelujejo v metabolizmu biosinteze aminokislin, kažejo nižje ravni izražanja

Med vsemi identificiranimi geni, ki sodelujejo v metabolnih poteh bakterije *E. coli*, smo uspeli za primerjave med različnimi temperaturami skoraj v 95 % določiti razlike v ravneh izražanja le pri primerjavah C42\_25 in C37\_25 pri kontrolnem sevu bakterije *E. coli*. S tem smo dobili rezultate, ki ne potrjujejo soodvisnosti sprememb v metabolnih poteh produkcije rekombinantnih proteinov (preglednice od 22 do 26). Najpogosteje spremembe v ravneh izražanja genov so bile pri metabolizmu energetskih poti (glikoliza, Krebssov cikel ...) in biosintezi aminokislin (biosinteza aminov, celičnih struktur in aminokislin). Podobne rezultate (preostalih 5 %) smo dobili pri primerjavah P42\_25 in P37\_25 pri produkcijskem sevu bakterije *E. coli*. Ob upoštevanju ugotovitev Gadgil in sod. (2005), da so pri genih, ki sodelujejo v energetskih poteh glikolize, pri nižjih temperaturah vidne nižje ravni izražanja genov, kar je posledica zmanjšanja porabe glukoze in redukcije NADH v poteh glikolize, smo želeli preveriti, ali je podoben trend tudi pri naših rezultatih. Iz rezultatov (preglednici 22 in 23) smo ugotovili, da hibridizacije večinoma potrjujejo predhodne ugotovitve, saj so bile višje ravni izražanja vidne pri večjem številu genov pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C. Nekaj je bilo tudi takih, pri katerih omenjenih sprememb v izražanju nismo opazili. Rezultati sprememb v ravneh izražanja genov z zapisom za proteine, ki sodelujejo v metabolizmu biosinteze aminokislin (preglednica 24), pretežno kažejo višje izražanje pri nižji temperaturi (25 °C). Naši rezultati tako v celoti ne podpirajo predhodnih ugotovitev (Gadgil in sod., 2005; ter Cheng in Lee, 2010) o manjših potrebah po sintezi aminokislin v produkciji proteinov pri nižjih temperaturah. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklenemo le, da za spremembe v ravneh izražanja genov (v odvisnosti od temperature), ki sodelujejo v metabolnih poteh bakterije *E. coli*, ne moremo potrditi povezave s tvorbo nkIT, saj smo omenjene rezultate dobili skoraj v celoti le pri kontrolnem sevu bakterije *E. coli*. Potrdili smo le-to, da zvišanje temperature vpliva na izražanje genov, ki sodelujejo v metabolizmu energetskih poti in metabolizmu biosinteze aminokislin v celici bakterije *E. coli*.

### 5.1.3.2 Pri nižji temperaturi produkcija rekombinantnega proteina hG-CSF lahko vpliva na gene, ki sodelujejo v metabolnih poteh bakterije *E. coli*

Pri nižji temperaturi ( $25^{\circ}\text{C}$ ) smo pri večjem številu genov, ki sodelujejo v metabolizmu energetskih poti, biosintezi aminokislin ter biosintezi kofaktorjev in sekundarnih metabolitov (preglednice 27, 28 in 29), videli nižje ravni izražanja, če smo primerjali produksijski in kontrolni sev bakterije *E. coli*. Kot smo že omenili, smo tudi pri primerjavi produksijskega in kontrolnega seva bakterije *E. coli* največ razlik v izražanju genov dobili pri  $37^{\circ}\text{C}$  in  $42^{\circ}\text{C}$ . Če upoštevamo (Kwon in sod., 1996), da je pri nižji temperaturi izkoristek biomase večji, saj se zniža stopnja rasti bakterije in s tem posledično stopnja tvorbe toksičnih produktov, lahko sklenemo, da so pri nižji temperaturi interakcije med proteini manj otežene, kar lahko povzroči različno oziroma povečano produkcijo rekombinantnih proteinov. Z našimi rezultati o spremembah v ravni izražanja omenjenih genov nismo potrdili povezave s trditvami (Kwon in sod., 1996).

### 5.1.4 Pregled razlik v izražanju posameznih genov, ki nosijo zapis za molekulske šaperone in proteaze

Zaradi velikega pomena komunikacije med molekulskimi šaperoni in od ATP odvisnimi proteazami, ki skupaj tvorijo izpopolnjen nadzorni sistem kontrole kvalitete proteinov (Schuman in Ferreira, 2004), smo se še posebno osredotočili na izražanje genov, ki nosijo zapis za te proteine. Hkrati so nas zanimali tudi vplivi ostalih proteinov, npr. faktorjev hsr, ki so prav tako izjemno pomembni pri nastajanju gostiteljevih in rekombinantnih proteinov.

Pri tem smo upoštevali eno od definicij odziva hsr, ki pravi, da je odziv hsr pomembna adaptacija, ki spodbuja preživetje posameznega organizma pri visokih temperaturah, kjer pride do aktivacije delovanja celotnega nabora genov (Chuang in Blattner, 1993). Prav ta odziv hsr vodi nato v indukcijo genov *hsr*, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine (Guisbert s sod., 2004). Večji del z odzivom hsr povezanih genov je pravzaprav pod nadzorom transkripcijskega iniciacijskega faktorja  $\sigma^{32}$ , za katerega zapis nosi gen *rpoH* (Guisbert s sod., 2004 ter Meyer in Baker, 2011). Faktor  $\sigma^{32}$  namreč spodbuja transkripcijo genov v proteine Hsp (angl. *heat shock proteins*) pod vsakršnimi pogoji tako, da encim RNA-polimeraze (RNAP), vezan na faktor  $\sigma^{32}$ , prepoznavata genske promotorje hsg (angl. *heat shock genes*) in posledično prepisuje specifične gene *hsr*, ki nosijo zapise za molekulske šaperone, kot so GroEL/S in DnaK/J, ter proteaze, kot so Lon in FtsH. Celo več, transkripcija genov *hsr* je pod nadzorom gena *rpoH* odvisna od interakcij s šaperoni, kot sta DnaK in DnaJ, ter od stabilnosti faktorja  $\sigma^{32}$  (pod nadzorom interakcij s proteazami, največ s

FtsH) (El-Samad in sod., 2004). To dokazuje, da imajo šaperoni in proteaze še dodatno funkcijo pri regulaciji odziva hsr.

Najbolj preučevani molekulski šaperoni, ki so v citoplazmi bakterije *E. coli*, so prav od ATP odvisni sistemi DnaK-DnaJ-GrpE in GroEL-GroES. Veliko dodatnih citoplazemskih proteinov domnevno tudi deluje kot molekulski šaperoni, med njimi so ClpB, HtpG in IbpA (Baneyx, 1999).

Iz rezultatov (preglednici 30 in 31) in ob upoštevanju že naštetih dejstev ter podatkovnih zbirk EcoCyc, KEGG in večine člankov, navedenih v poglavju Literatura (Arifuzzaman in sod., 2006; Vanz in sod., 2008; Gottesman, 1996; Guisbert in sod., 2004; Chuang in Blattner, 1993; ter Meyer in Baker, 2011), smo uspeli identificirati značilno različne spremembe v ravneh izražanja kar 26 genom od približno 131 genov, ki nosijo zapis za molekulske šaperone, proteaze, faktorje sigma in ostale proteine, ki so povezani z nastankom odziva hsr bakterije *E. coli*.

#### 5.1.4.1 Statistično značilno različno izražanje genov, ki nosijo zapis za šaperone

##### **5.1.4.1.1 Ravni izražanja genov *groEL* in *dnaK*, ki nosita zapis za šaperona GroEL in DnaK, potrjujejo teze o povečani aktivaciji obeh šaperonov pri zvišani temperaturi in kažejo na pomembno funkcijo sodelovanja pri tvorbi agregatov**

Na podlagi rezultatov (preglednica 30) smo ugotovili, da so ravni izražanja genov, ki nosita zapis za dva najbolj preučevana molekulski šaperona v citoplazmi bakterije *E. coli* (Baneyx, 1999), tj. proteina GroEL (kodira gen *groEL*) in DnaK (kodira gen *dnaK*), pri 42 °C glede na 25 °C (v produkcijskem in kontrolnem sevu) v skladu s predhodnimi ugotovitvami (Sherman in Goldberg, 1993). Šaperon DnaK je bistven za preživetje celic pri višjih temperaturah, raven izražanja gena *dnaK* (preglednica 30) pa se je za nekajkrat zvišala ob vplivu temperaturnega stresa. Podobno se je ob odzivu hsr zvišala tudi raven izražanja gena *groEL* (preglednica 30), kar je prav tako v skladu z ugotovitvami (Chatellier in sod., 1998), da je delovanje kompleksa GroEL/ES bistveno za biosintezo proteinov in njihovo okrevanje po temperaturnem stresu. Rezultate o indukciji sinteze GroEL oziroma izražanju *groEL* smo potrdili tudi z analizo Western in s qPCR.

Spremembe v ravneh izražanja istih dveh genov pa nismo zaznali pri 37 °C v primerjavi s 25 °C v kontrolnem in produkcijskem sevu bakterije *E. coli*. Pomislili smo, da so ti rezultati najverjetneje posledica tega, da so ravni izražanja *groEL/ES* in ostalih genov *hsr* odvisni od

ravni izražanja gena *rpoH* (*htpR*) (Yura in sod., 1984), katerega izražanje je odvisno od sprememb temperature (Meyer in Baker, 2011). Gen *rpoH* je potreben za izboljšano transkripcijo operonov genov *hsr* ob izpostavljenosti visokim temperaturam, saj se ob njegovi odsotnosti poveča indukcija proteinov odziva *hsr*. Raziskave so tudi pokazale, da bakterija *E. coli* potrebuje *rpoH* pri 37 °C (Yura in sod., 1984). Podobno kažejo naši rezultati pri analizi s qPCR v kontrolnem sevu, kjer smo dobili nižje izražanje gena *groEL* (preglednica 32). V potrditev omenjenega je Yura s sod. (1984) navedel ugotovitve, da je pri 30 °C, kjer je bilo izražanje gena *rpoH* nižje, sinteza proteinov odziva *hsr* prav tako nižja. Vendar ta dejstva niso bila edini razlog za prej opisane lastnosti gena *rpoH*, saj so najverjetneje izhajala še iz drugih ravni regulacije aktivnosti proteina RpoH (Guisbert in sod., 2004), med drugim vpliva ostalih pomembnih šaperonov, kot so IbpA, IbpB, GroEL/ES in DnaK/J/GrpE, ter proteaz, kot so FtsH, HslVU, Clp in Lon (Meyer in Baker, 2011). Zgoraj omenjena dejstva smo podprli tudi z našimi rezultati hibridizacij (podatki niso prikazani), saj nismo ugotovili nobenih razlik v spremembah ravni izražanja gena *rpoH* pri kateri koli temperaturi, medtem ko smo večje spremembe v ravni izražanja genov *groEL* in *dnaK* ugotovili pri 42 °C glede na 25 °C pri obeh sevih bakterije *E. coli*. Glede na to, da čezmerna produkcija šaperonov GroES in GroEL ter DnaK in DnaJ negativno vpliva na tvorbo agregatov, tj. da omenjeni šaperoni preprečujejo proteinsko agregacijo (Gragerov in sod., 1992; ter Hartl, 1996), in ob dejstvu, da večina rekombinantnih proteinov tvori aggregate v obliki inkluzijskih teles, lahko sklepamo, da pri zvišanih temperaturah (predvsem pri 42 °C) zasledimo večji vpliv na produkcijo rekombinantnih proteinov in posledično na tvorbo inkluzijskih teles. To pomeni večji vpliv na akumulacijo rekombinantnega proteina. Zanemarljiv ni tudi vpliv proteaz, ki pospešeno delujejo ob zvišanih temperaturah, kar podrobnejše obravnavamo v nadaljevanju. V nedavnih raziskavah so na inštitutu za biokemijo Max Planck (The dance of the chaperones, 2012) Calloni in sodelavci (2012) ugotovili in s tem ponovno potrdili, da imata pri agregaciji proteinov oziroma njihovem pravilnem zvijanju ključno vlogo šaperona DnaK in GroEL. Ponovno ne gre pozabiti, da je agregacija oziroma pravilno zvijanje proteinov zelo odvisna tudi od koncentracije posameznega proteina, tj. od njegove prisotnosti v celici in posledično njegove interakcije s šaperoni, kot sta DnaK in GroEL. To pomeni, da ko je protein prisoten v celici v večji koncentraciji, za pravilno zvijanje niso potrebne velike koncentracije šaperonov DnaK in GroEL. Z drugimi besedami, manjša ko je koncentracija posameznih proteinov znotraj celice, bolj potrebujejo šaperone, kot sta DnaK in GroEL, za pravilno zvijanje. Sicer se predvsem ob odsotnosti šaperona DnaK kaže povečana razgradnja oziroma agregacija (Calloni in sod., 2012). Naši rezultati (preglednica 30) vsekakor potrjujejo zgornje ugotovitve o zvišanih ravneh izražanja genov, ki nosijo zapis za pomembne šaperone pri zvišani temperaturi, vendar s tem neposredne povezave z zvišano ravnjo produkcije rekombinantnega proteina hG-CSF pri nižji temperaturi nismo potrdili.

#### **5.1.4.1.2 Ujetje šaperona GroEL v neklašičnih inkluzijskih telesih najverjetneje vpliva na višje ravni akumulacije aktivnega rekombinantnega proteina hG-CSF pri nižji temperaturi**

Ob tem se nam je porodila zanimiva teza. Villaverde in Carrio (2003) sta poročala, da naj bi šaperona GroEL in DnaK delovala tako, da si vse proteine, ki morajo skozi sistem pravilnega zvijanja (npr. rekombinantni protein hG-CSF), najprej "oblikujeta" v posebna inkluzijska telesa in jih nato po vrsti obdelujeta po znanem mehanizmu (Hartl, 1996) tako, da jih pregledata in se odločita, kateri gredo skozi sistem zvijanja in kateri v sistem razgradnje s proteazami. Podoben sistem soodvisnosti šaperonov DnaK in GroEL so opisali tudi Calloni in sodelavci (2012), saj naj bi šaperon DnaK vse tiste proteine, ki jim sam ne uspe pomagati v procesu zvijanja, vodil do šaperona GroEL. Le-ta naj bi v nadaljevanju sklenil obroč okoli tarčne proteinske verige, jo s tem zaščitil ter ji pomagal do pravilnega zvitja. Ob spremembri temperature nastane tudi stres, zaradi katerega se bakterija *E. coli* začne prilagajati novim razmeram. Njen Quorum sensing začne delovati tako, da najprej poskrbi za svoj obstoj, tj. deluje tako, da sistemi GroEL-GroES ter DnaK-DnaJ-GrpE najprej zagotavljajo obstoj pravilnega zvitja proteinom, pomembnim za preživetje bakterije *E. coli*, šele nato skrbijo za »pakete« rekombinantnih proteinov in jih tako prepuščajo proteazam v razgradnjo. Po drugi strani sta Carrio in Villaverde (2005) poročala, da sta znotraj inkluzijskih teles dokazala obstoj aktivnih molekul šaperona GroEL, kar prav tako lahko potrjuje, da je pri nižjih temperaturah produkcija pravilno zvitih rekombinantnih proteinov neprimerno večja kot pri višjih zaradi omenjenih razlogov. Zanimivo je tudi spoznanje, do katerega so prišli Frieden in Clark (1997) ter Villaverde in Carrio (2003), da šaperon GroEL izkazuje precej veliko afiniteto vezave s proteinimi, ki vsebujejo hidrofobne aminokislinske ostanke. Glede na to, da naš rekombinantni protein hG-CSF vsebuje 30 aminokislinskih ostankov dolgo hidrofobno sekrecijsko signalno zaporedje (G-CSF, 2010), lahko predpostavimo, da je afiniteta vezave šaperona GroEL na hG-CSF povečana, kar lahko potrjuje večjo koncentracijo proteina hG-CSF pri nižji temperaturi.

#### **5.1.4.1.3 Vpliv DnaJ na agregacijo rekombinantnega proteina hG-CSF ni povsem potrjen**

Rezultati (preglednica 30) kažejo, da so spremembe v ravni izražanja gena *dnaJ* vidne (višje izražanje) le pri 42 °C glede na 25 °C (produkcijski sev), pri ostalih pogojih pa skoraj niso vidne. To je zanimivo, saj je gen *dnaJ*, in posledično protein DnaJ, neposredno pod kontrolo faktorja  $\sigma^{32}$ . DnaJ je po navadi vezan v kompleksu s šaperonom DnaK, ki se ob temperaturnem stresu sprosti in veže z denaturiranimi proteini, kar povzroči aktivacijo faktorja  $\sigma^{32}$ , ki spodbudi transkripcijo genov *hsr* (Sherman in Goldberg, 1993). Ob dobljenih rezultatih hibridizacij smo pomislili, da je razlog morda to, da je za nespremenjene ravni v izražanju

gena *dnaJ* pri ostalih temperaturah odgovoren tretji predstavnik kompleksa DnaK-DnaJ-GrpE, torej gen *grpE*, ki nosi zapis za protein GrpE, katerega funkcija je pospeševanje sprostitve molekule ADP z molekule DnaK, kar lahko povzroči umik proteina DnaJ iz ternarnega kompleksa (Hartl, 1996). Rezultati (niso prikazani) so pokazali, da sprememb v ravni izražanja gena *grpE* pri različnih temperaturah ni bilo, zaradi česar nismo znali pojasniti razlogov za razlike v izražanju. Zato tudi nismo mogli potrditi neposrednega vpliva na nastanek nkIT in akumulacije proteina hG-CSF.

#### **5.1.4.1.4 Raven izražanja genov, ki nosijo zapis za ostale šaperone in s stresom inducirane proteine, je pri zvišani temperaturi različna**

Thomas in Baneyx (1999) sta predlagala veliko citoplazemskih proteinov, ki naj bi delovali kot molekulski šaperoni, med njimi ClpB (*htpM*), HtpG in IbpA. Vendar rezultati naših hibridizacij ne kažejo nobenih sprememb v ravneh izražanja genov, ki nosijo zapise za omenjene šaperone, pri vseh temperaturah razen pri IbpA (preglednica 30).

Najprej je pomembno, da čezmerno izražanje gena *groEL* vpliva na izražanje genov *clpB* in *ibp* (in posledično tvorbo šaperonov), saj je bilo predhodno dokazano, da delecijske genove *clpB*, *htpG* in *ibp* pri 42 °C ne vplivajo na celično rast. Medtem ko šaperona ClpB in HtpG aktivno sodelujeta s sistemom GroEL-GroES, pa majhni bakterijski proteini Hsr (IbpA in IbpB) ne sodelujejo (Thomas in Baneyx, 1998). Glede na to, da je vloga proteinov IbpA in IbpB v ponovni aktivaciji proteinov, ki so pod vplivom zunanjih dejavnikov (temperaturni stres), razmeroma majhna ter da se kot odgovor na stres in odsotnost proteinov Hsp prej aktivirajo alternativne celične poti (Thomas in Baneyx, 1998), predpostavljamo, da neposredne povezave med nastankom nkIT in akumulacijo proteina hG-CSF ter delovanjem proteinov IbpA ter IbpB ne moremo potrditi.

Pri ostalih genih, ki nosijo zapis za šaperone in proteine, ki se inducirajo ob stresu (preglednica 30), smo spremembe v zvišani ravni izražanja pri 42 °C glede na 25 °C (kontrolni sev) opazili le pri genu *uspD*. Nižjo raven izražanja smo opazili še pri nekaterih genih pri 42 °C glede na 25 °C (kontrolni sev). Ti geni so bili *ccmE* (CcmE, periplazemski šaperon za prenos kisika v krvi, hem), *fliQ*, *fliY* in *hslR*.

Za spremembe v ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za šaperone, in ostale s stresom inducirane gene pri 37 °C glede na 25 °C (preglednica 30) smo opazili, da višjega izražanja ni bilo pri nobenem od značilno različno izraženih genov (kontrolni sev), nižje izražanje pa smo opazili pri genih *clpS*, *ecpD* (potrjeno tudi s qPCR, preglednica 32), *fliJ*, *fliQ*, *uspE* ter *torD* (tudi potrjeno s qPCR, preglednica 32).

Višja raven izražanja gena *uspD* pri 42 °C glede na 25 °C pri naših hibridizacijah (preglednica 30) delno potrjuje ugotovitve (Gustavsson in sod., 2002; temperatura ni bila podana), da so geni *uspC*, *uspD* in *uspE* inducirani kot posledica vpliva stresa na rast celic. Glede na podana dejstva in naše rezultate menimo, da samo na podlagi tega ne moremo potrditi neposrednega vpliva omenjenega gena na nastanek nkIT.

Za gen *ecpD* je značilno, da je njegova transkripcija inducirana s prehodom temperature z 22 °C na 37 °C in na 42 °C (Raina in sod., 1993). Če upoštevamo, da je temperaturno inducirana transkripcija neodvisna od genskega produkta *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) (Raina in sod., 1993), ki se aktivira ob zvišani temperaturi (Guisbert in sod., 2004), in da je izmed treh transkripcijskih mest začetka prepisa eden pod pozitivnim vplivom gena *katF* (*rpoS*), ki kodira omenjeni faktor  $\sigma$ , potreben za transkripcijo velikega števila genov, potrebnih pri logaritemski fazì rasti bakterije (Raina in sod., 1993), lahko ugotovimo, da naši rezultati hibridizacij neposredno ne potrjujejo neodvisnosti gena *ecpD* od gena *rpoH*. Prav tako ni bila potrjena odvisnost gena *ecpD* od gena *rpoS*, niti povečana indukcija gena *ecpD* z zvišanjem temperature, saj naši rezultati pri 37 °C (pri 42 °C nismo določili značilno različne spremembe v izražanju) glede na 25 °C kažejo nižje izražanje gena *ecpD*, kar delno nasprotuje prvotni tezi o njegovi indukciji pri višjih temperaturah (preglednica 30). Rezultati reakcij, dobljenih z analizo qPCR (preglednica 32), tudi ne dokazujejo zgornjih tez, saj je raven izražanja pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C (za producijski in kontrolni sev) ostala nespremenjena.

Na podlagi zgornjih trditev in funkcije proteina EcpD, ki ga kodira gen *ecpD* (prenos protonov iz membrane v citoplazmo) (Cain in Simonig, 1989), lahko sklenemo, da za spremembe v ravni izražanja genov, ki sodelujejo v procesih, povezanih z nastankom proteinov, glede na temperaturne spremembe ni mogoče neposredno potrditi povezave s tvorbo nkIT in akumulacijo proteina hG-CSF.

Pri pregledovanju rezultatov je našo pozornost pritegnila tudi posebna skupina genov, kot so *fliJ*, *fliQ* in *fliY*, ki sodelujejo pri nadzoru gibanja bakterije *E. coli* in so pod vplivom faktorja sigma 28 ( $\sigma^{28}$ ). Rezultati hibridizacij so pokazali (preglednica 30), da so spremembe v ravni izražanja omenjenih genov pri 42 °C in 37 °C glede na 25 °C (za kontrolni sev) v vseh primerih vedno nižje, kar bi lahko pomenilo, da ima bakterija *E. coli* pri zvišani temperaturi težave z gibanjem. To nas je presenetilo predvsem pri 37 °C, saj vemo, da je optimalna temperatura delovanja bakterije *E. coli* prav pri 37 °C. Zato smo v nadaljevanju poskušali preučiti morebitne razloge za take rezultate s pregledom že objavljene literature.

Periplazemski protein FliY (ki ga kodira gen *fliY*, Mytelka in sod., 1995), ki nase veže cistinske proteine (Butler in sod., 1993), je del družine proteinov, ki sodelujejo pri nadzoru transkripcije tipa III. Za protein FliY se predpostavlja, da ni potreben za mobilnost, ampak je njegova vloga v nadzoru aktivnosti faktorja sigma 28, ki ga kodira gen *rpoF* ( $\sigma^{\text{Foz. }}\sigma^{28}$ ) (Mytelka in sod., 1995). Gen *rpoF* je eden manjših predstavnikov genov, ki nosijo zapis za faktorje  $\sigma$ , odgovoren za začetek transkripcije velikega števila genov, odgovornih za mobilnost, katerega ravni izražanja se znatno znižajo ob temperaturnem stresu (Jishage in sod., 1996). Sami sicer nismo opazili statistično značilno različnih sprememb v izražanju omenjenega gena (rezultati niso prikazani), zato lahko le sklenemo, da supresija gena *fliY* povzroči negativno regulacijo *rpoF*. Seveda na podlagi teh značilnosti nikakor ne moremo povezati delovanja *fliY* z vplivom na gene, ki sodelujejo v procesih, povezanih z nastankom proteinov oz. tvorbo agregatov ali tvorbo nkIT in posledično na akumulacijo proteina hG-CSF. Sklepamo lahko le, da je pri 42 °C glede na 25 °C oteženo delovanje bičkov bakterije *E. coli*, kar pa lahko povzroča težave predvsem pri interakcijah z drugimi organizmi.

V primeru genov *fliQ*, ki nosi zapis za protein FliQ, enega od šestih v membrano vgrajenih komponent transportnega aparata (delovanje prek bičkov) (Minamino in sod., 2004), in *fliJ*, ki nosi zapis za protein FliJ, enega od treh topnih komponent istega sistema (Minamino in sod., 2004), so naši rezultati hibridizacij pokazali (preglednica 30), da so spremembe v ravni izražanja pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C (kontrolni sev) manjše (za gen *fliJ* samo v primeru 37 °C), kar ponovno potrjuje, da je pri višjih temperaturah transportni aparat prek bičkov onemogočen, tako da povzroča težave pri interakcijah bakterije *E. coli* z drugimi organizmi. Vzročne povezave med izražanjem omenjenih dveh genov in genov, ki sodelujejo v procesih, povezanih z nastankom rekombinantnih proteinov oz. tvorbo nkIT in akumulacijo proteina hG-CSF, seveda s temi dejstvi ne moremo potrditi, saj smo spremembe zaznali le pri analizi kontrolnega seva.

V primeru gena *clpS*, ki nosi zapis za protein ClpS, ki se veže na N-konec proteina ClpA in s tem vpliva na specifičnost razgradnje proteinov s pomočjo kompleksa ClpAP (kompleks šaperon-proteaza) tako, da otežuje interakcije med substratom in ClpA (Dougan in sod., 2002), so naši rezultati pokazali, da so pri 37 °C glede na 25 °C (samo za kontrolni sev) ravni izražanja omenjenega gena nižje. Vzročne povezave med izražanjem omenjenega gena, tvorbo nkIT in akumulacijo proteina hG-CSF tako nismo mogli potrditi, saj se v produkcijskem sevu razlika v izražanju ni pokazala.

#### **5.1.4.1.5 Ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za faktorje sigma ter ostale proteine Hsp in regulatorje sigma, pri različnih temperaturah ostajajo skoraj nespremenjene; *hslR* je izjema**

Rezultati hibridizacij (preglednica 30) kažejo, da so spremembe v ravni izražanja posameznih genov, ki nosijo zapis za sigmafaktorje, opazne le v primeru gena *hslR*. Opazili smo namreč nižje izražanje pri 42 °C v primerjavi s 25 °C v kontrolnem sevu.

Pri tem nas je presenetilo, da se primerjalno ravni izražanja pri različnih temperaturah vseh genov, ki nosijo zapis za sigmafaktorje, niso spremenile, kljub temu da zanje velja, da se v primeru vpliva zunanjih dejavnikov, kot je temperaturni stres, njihove ravni spremenijo (Lewin, 1997) ter nato vplivajo na aktivacijo operonov genov, ki nosijo zapis za pomembne stresne proteine. Glede na prikazane spremembe v ravni izražanja ostalih genov smo predvidevali, da je njihova »neregulacija« posledica dejstva, da se (kot velja že za gen *rpoH*) ob vsakršnem dvigu temperature ravni izražanja omenjenih genov ne spreminja, medtem ko se njihova aktivnost neprimerno zviša (Guisbert in sod., 2004). Da bi lahko potrdili, da se aktivnost res zviša, bi bilo treba preveriti biološko aktivnost proteinov, ki jih kodirajo omenjeni geni, kar je zanimiva tema za nadaljnje raziskave.

V primeru splošnega faktorja stresa RpoS, ki ga kodira gen *rpoS*, sprememb v ravni izražanja (rezultati niso prikazani) pri gojenju produkcijskih in kontrolnih sevov bakterije *E. coli* pri različnih temperaturah nismo opazili. To je v skladu z ugotovitvami Notley-McRobb in sod. (2002), da se transporterji, kot je na primer LamB (transporterji, ki lajšajo difuzijo maltoze in ostalih maltodekstrinov skozi zunano membrano), aktivirajo pri višjih stopnjah rasti in večjih koncentracijah glukoze še pred aktivacijo proteina RpoS. Zato smo preverili tudi spremembe v ravni izražanja gena *malL*, ki nosi zapis za protein LamB, vendar rezultati hibridizacij (rezultati niso prikazani) niso pokazali sprememb v ravni izražanja pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C.

Z drugimi besedami, bakterija *E. coli* s stalno rastjo kulture zvišuje tudi ravni izražanja gena, ki nosi zapis za protein RpoS, če se koncentracija glukoze zmanjša, pa to vpliva na aktivacijo od RpoS odvisnih zaščitnih funkcij, značilnih za stacionarno fazo rasti. Ker je naše produkcijsko gojišče bogato z glukozo (gojišče GYSP), je prav to lahko potrditev za nespremenjene ravni v izražanju gena *rpoS*. Naše ugotovitve so tudi v skladu z ugotovitvami (Ruiz in sod., 2001), da je v primeru, ko je v gojišču zadostna količina hranilnih sredstev, vpliv na ravni izražanja gena, ki nosi zapis za protein RpoS, majhen. Nizke ravni proteina RpoS pa so lahko tudi posledica delovanja od ATP odvisne serinske proteaze ClpXP. Proteaza ClpXP razgrajuje RpoS, ko začne hranilnih sredstev primanjkovati. Če se od ClpXP odvisna

proteoliza zaustavi, to pomeni, da se ravni proteina RpoS zvišajo (Ruiz in sod., 2001). Zanimivo je tudi, da čeprav smo naše seve bakterije *E. coli* BL21 (DE3), gojene pri različnih temperaturah, pobrali ob prehodu iz logaritemske v stacionarno fazo, ko naj bi bilo izražanje gena *rpoS* največje (Mulvey in sod., 1990; Lange in Hengge-Aronis, 1994; ter Takayanagi in sod., 1994, so poročali o od 5- do 10-kratnem povečanju izražanja gena *rpoS* ob prehodu iz logaritemske v stacionarno fazo), naši rezultati hibridizacij ne kažejo sprememb (prav tako ni bistvenih sprememb v ravni izražanja genov *clpX* in *clpP*, ki nosita zapis za proteazi ClpX in ClpP, pri različnih temperaturah) in ne podpirajo zgornjih trditev. Potrjujejo le, da pri naših pogojih gojenja bakterijskih sevov ni bilo pomanjkanja glukoze, kar vsekakor odpira možnosti za nadaljnje raziskave.

Faktor sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ), ki ga kodira gen *rpoD*, je prevladujoč faktor sigma med logaritemsko fazo rasti (Jishage in sod., 1996). Naši rezultati hibridizacij niso pokazali sprememb v ravni izražanja gena *rpoD* (rezultati niso prikazani) med kulturami sevov bakterije *E. coli*, gojenimi pri različnih temperaturah. To potrjuje, da smo kulture zajeli še v logaritemski fazi, pred prehodom v stacionarno fazo.

Sklepamo torej, da glede na spremembe v ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za faktorje sigma, v odvisnosti od temperature ni mogoče trditi, da bi ti geni neposredno vplivali na tvorbo nkIT in ravni akumulacije rekombinantnega proteina v inkluzijskih telesih. Drži pa, da je izražanje ostalih genov (npr. *groEL*, *dnaK*), ki so pod nadzorom omenjenih sigmafaktorjev, spremenjeno pri različnih temperaturah. S tem lahko potrdimo, da so kljub temu, da nismo uspeli ugotoviti sprememb v ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za faktorje sigma, pri različnih temperaturah, ti geni še vedno aktivni, kar kaže na njihovo posredno vlogo.

Pomemben je še vpliv delovanja proteaze YaeL (kodira gen *rseP* (*yaeL*)) na proteina RpoE in RpoH. Za proteazo YaeL v notranji membrani (Dartigalongue in sod., 2001) je znano, da sodeluje s proteinom DegS (kodira gen *degS*), tako da ob stresu v zunanji citoplazmi skupaj s proteinom DegS katalizira proteolitično cepitev proteina RseA (kodira gen *rseA*) in s tem sprosti represijo gena *rpoE* ( $\sigma^E$ ), aktivira od *rpoE* pogojeni odgovor na stres (Kanehara in sod., 2002 ter Alba in sod., 2002) ter hkrati izraža proteolitično aktivnost v primerjavi s RpoE in RpoH. Prav tako čezmerna produkcija proteina YaeL inhibira transkripcijo, ki jo nadzoruje protein RpoE (Dartigalongue in sod., 2001). Sicer čezmerna produkcija proteina RpoE zavira delovanje proteina YaeL (Kanehara in sod., 2002). Iz tega bi lahko iz naših rezultatov (preglednica 30) sklepali, da smo potrdili čezmerno izražanje gena *rpoE* pri 25 °C glede na 37 °C in 42 °C, saj je pri obeh temperaturah izražanje gena *yaeL* nižje. Zanimivi so tudi rezultati primerjave izražanja gena *yaeL* pri 25 °C (preglednica 31) glede na produkcijski in kontrolni sev, saj kažejo, da je raven izražanja gena *yaeL* višje v produkcijskem sevu, kar bi lahko

potrjevalo posredno vlogo proteaze YaeL pri tvorbi nkIT in posledično vpliv na ravni akumulacije rekombinantnega proteina. Glede na to, da je delovanje proteaze YaeL izjemno pomembno pri zagotavljanju zadostnih koncentracij proteina RpoE, ki je potreben za podporo celici pri njenem preživetju (Ades, 2004), lahko iz naših rezultatov hibridizacij (preglednica 31) sklenemo, da je sposobnost preživetja celice pri nižji temperaturi toliko bolj povečana.

Naslednji gen, ki smo ga preučili, je bil *hslR*, ki kodira protein Hsp15 (protein odziva hsr, ki sodeluje z ribosomi). Ugotovljeno je bilo, da se produkcija Hsp15 neprimerno poveča ob zvišanju temperature in da sodeluje pri recikliraju proste 50S podenote ribosoma, ki nosi nastajajočo verigo (Korber in sod., 2000). Ob pregledu naših rezultatov hibridizacij (preglednica 30) smo ugotovili prav nasprotno, saj dokazujejo, da so spremembe v ravni izražanja gena *hslR* višje ob nižjih temperaturah, tj. sprememba v ravni izražanja pri 42 °C glede na 25 °C je nižja, kar predpostavlja večjo aktivnost pri nižjih temperaturah. Kljub temu neposredne povezave s tvorbo nkIT nismo potrdili, saj smo rezultate hibridizacij dobili le pri kontrolnem sevu bakterije *E. coli*.

Pri različnih temperaturah nas je zanimala tudi sprememba ravni izražanja gena *rssB* (*sprE*) (protein RssB/SprE). Znano je, da je transkripcija *rssB* soodvisna od *rpoS*. To pomeni, da je raven izražanja gena *rssB* odvisna od relativne količine gena *rpoS* in da je količina gena *rpoS* odvisna od količine gena *rssB*, ki je na razpolago za inaktivacijo gena *rpoS* (Gibson in sod., 2000; Ruiz in sod., 2001; ter Prutentau in Hengge-Aronis, 2002). Ugotovljeno je bilo tudi, da so ravni izražanja gena *rssB* med logaritemsko fazo zelo nizke, vendar kljub temu zadostne za aktivacijo razgradnje proteina RpoS prek aktivacije proteaze ClpXP (kodirata gena *clpX* in *clpP*). Vendar pri vseh temperaturah sprememb v izražanju genov *clpX* in *clpP* nismo uspeli zaslediti (rezultati niso prikazani). Za SprE je bila ugotovljena tudi regulacijska vloga pri stabilizaciji tarčnih proteinov v logaritemski fazi. V tem primeru bi imela absolutna količina SprE regulatorno vlogo prek diferencialne afinitete na različne tarčne proteine. Po drugi strani je prav vzdrževanje zadostne količine proteina SprE zelo pomembno za bakterijo *E. coli*, saj njegova čezmerna produkcija povzroča precejšnje napake v rasti in izgube zmožnosti preživetja. Vendar pa pri vseh temperaturah sprememb v ravni izražanja gena *rssB* nismo uspeli zaslediti, zasledili smo le nižje izražanje pri 42 °C, če smo primerjali kontrolni in produksijski sev (preglednica 31). Ti rezultati potrjujejo le odvisnost prej omenjenih genov od prehoda med logaritemsko in stacionarno fazo ter hkrati neodvisnost od temperturnih sprememb. S tem vpliva na produkcijo rekombinantnega proteina in nastanka nkIT in akumulacijo proteina hG-CSF ne moremo potrditi.

### 5.1.4.2 Statistično značilno različno izražanje genov, ki nosijo zapis za proteaze

Nato smo se osredotočili na preučevanje proteaz. Zanimalo nas je, kakšno vlogo imajo proteaze glede na spremembe v ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za proteaze, v odvisnosti od vpliva temperature. Kot je poročala Gottesman (1996) je proteoliza v bakteriji *E. coli* potrebna za odstranitev celic, ki vsebujejo napačne in nepravilno zvite proteine, ter za omejitve časa in količin nastanka regulatornih proteinov. Večina znotrajcelične proteolize je tudi odvisna od energijsko odvisnih proteaz, med katerimi so najpomembnejše Lon, ClpXP in HflB. Slednja je po mnenju Gottesman (1996) tudi najpomembnejša. Iz rezultatov (preglednica 30) ugotovimo spremembe v ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za proteaze, pri enem genu, ki nosi zapis za citoplazemske proteaze, treh genih, ki nosijo zapis za proteaze (v citoplazemski membrani), ter pri treh genih, ki nosijo zapis za proteaze, ki so v periplazmi.

#### 5.1.4.2.1 Delovanje citoplazemske aminopeptidaze Xaa-Pro in citoplazemske proteaze YeaZ lahko vpliva na uspešnejšo akumulacijo hG-CSF pri 25 °C

Če primerjamo ravni izražanja gena *ampP/pepP* (ravni sicer niso bile statistično značilno različne, trend pa se izraža), ki nosi zapis za Xaa-Pro-aminopeptidazo oz. eksopeptidazo, ta pa cepi N-končne ostanke polipeptidov, vse dokler je na naslednjem mestu od mesta cepitve ostanek proлина (Yoshimoto in sod., 1988), smo pri produksijskem sevu pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C in pri kontrolnem sevu pri 42 °C glede na 25 °C videli razlike v ravneh izražanja (višje izražanje), pri kontrolnem sevu pri 37 °C glede na 25 °C pa nižje izražanje (rezultati niso prikazani). Vendar smo se odločili, da zaradi funkcije delovanja omenjene proteaze in strukture proteina hG-CSF predstavimo potencialno vlogo omenjene eksopeptidaze.

Ker ima protein hG-CSF na mestu 3 ostanek proлина in nato še na mestih 6, 11, 45 itn. (Wingfield in sod., 1988), ter ob upoštevanju, da je sprostitev katere koli aminokisline z N-konca (vključujoč prolin), ki je vezana na prolin, celo iz dipeptida ali tripeptida, mogoča (BRENDA, 2010 ter Graham in sod., 2003), in glede na prej podane rezultate hibridizacij lahko predpostavimo, da omenjena proteaza vpliva na manjšo produkcijo rekombinantnih proteinov pri višjih temperaturah. To pomeni, da je akumulacija le-tega lahko znižana. V našem primeru je produkcija proteina hG-CSF pri višjih temperaturah omejena oz. je lahko uspešnejša pri 25 °C.

Rezultati hibridizacij hipotetične proteaze YeaZ (kodira gen *yeaZ*) kažejo, da je omenjenega gena pri vseh temperaturah manj v produksijskem sevu kot v kontrolnem sevu. Čeprav ravni niso bile statistično značilno različne, se trend izraža (vsi rezultati niso prikazani). Kljub

nasprotujočim si rezultatom so nas vseeno zanimali podatki, ki bi povezovali delovanje omenjene proteaze z nastankom tvorbe agregatov in posledično akumulacijo proteina hG-CSF. Pri tem smo ugotovili, da literatura sicer poroča o sodelovanju proteaze YeaZ s proteinoma YjeE in YggD, tako da skupaj tvorijo interaktivno mrežo, vendar njihova funkcija delovanja še ni povsem raziskana (Handford in sod., 2009). Prav tako proteaza YeaZ deluje kot proteaza, ki specifično razgrajuje protein YggD (kodira ga gen *yggD/gcp*) (Handford in sod., 2009). Na podlagi teh dejstev smo pregledali tudi rezultate hibridizacij gena *yggD*, vendar le-ti (rezultati niso prikazani) niso kazali nobenih sprememb v ravni izražanja gena pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C tako v primeru produkcijskega kot v primeru kontrolnega seva. Kljub temu je lahko proteaza YeaZ eden ključnih dejavnikov, ki vpliva na ravni akumulacije rekombinantnih proteinov, in zanimivo področje za nadaljnje raziskave.

#### **5.1.4.2.2 Pri višjih temperaturah so ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za proteaze citoplazemske membrane, nižje**

Rezultati hibridizacij genov, ki nosijo zapis za proteaze v citoplazemski membrani, kažejo, da je do sprememb v ravni izražanja prišlo pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C le v primeru treh genov, ki nosijo zapis za proteaze (preglednica 30), *glpG*, *sohB* in *yaeL*.

Spremembe v ravni izražanja genov *glpG* in *yaeL*, ki nosita zapis za proteazi GlpG in RseP, kažejo, da smo pri 37 °C glede na 25 °C (kontrolni sev) za gen *glpG* dobili višje izražanje, za gen *yaeL* (produkcijski sev) pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C pa nižje izražanje. Spremembe v ravni izražanja gena *sohB* potencialne serinske proteaze SohB (kontrolni sev) kažejo na nižje izražanje pri 37 °C in 42 °C v primerjavi s 25 °C.

Če preučimo proteazo GlpG (kodira gen *glpG*), ki je v membrano zasidrana proteaza in kot taka tudi pomembna pri nadzoru proteolize znotraj membrane (Maegawa in sod., 2005), je o njenih biokemijskih lastnostih (Zeng in sod. 1996) do zdaj bolj malo znanega. Nedavne ugotovitve so pokazale, da struktura proteaze GlpG (v obliki zanke L1) sodeluje pri nadzoru orientacije proteina, zasidranega v lipidnem dvosloju, saj je pomemben za učinkovite interakcije z ostalimi substrati. Ugotovili so tudi, da je odvisnost konformacije zanke, ki vpliva na orientacijo in dinamičnost proteina, odgovorna za vpliv lipidov na proteolitično aktivnost proteaze GlpG (Bondar in sod., 2009). Če upoštevamo našteta dejstva in naše rezultate hibridizacij, ki kažejo na zvišane ravni izražanja gena *glpG* pri 37 °C glede na 25 °C le pri kontrolnem sevu (preglednica 30), lahko predpostavimo, da je vloga proteaze GlpG proteolitične narave. Iz vsega navedenega lahko sklenemo, da proteaza GlpG ne vpliva na ravni akumulacije proteina hG-CSF v citoplazemskem prostoru. Sklepamo lahko le na njeni

potencialno vlogo pri vplivu na ravni akumulacije rekombinantnih proteinov znotraj periplazemskega prostora, saj rezultatov hibridizacij pri produkcijskem sevu bakterije *E. coli* nismo dobili.

Druga, prav tako pomembna gena sta še *sohB* in *degP* (*htrA*), med katerima prihaja do interakcije (Baird in sod., 1991), saj je prav gen *sohB* supresor gena *degP*, katerega delovanje je odvisno od temperature. Dejstvo, da ima proteaza SohB (kodira gen *sohB*) strukturo homologno strukturi proteaze IV (Baird in sod., 1991), je zelo zanimivo in predlaga regulatorno vlogo proteaze SohB pri interakcijah s proteini med prenosom skozi citoplazemsko membrano (Ichihara in sod., 1984). Rezultati hibridizacij (preglednica 30), ki kažejo, da so ravni v izražanju gena *sohB* pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C (v kontrolnem sevu) nižje, tako indicirajo, da gen *sohB* ne vpliva na spremembe v ravni izražanja gena *degP* pri 42 °C glede na 25 °C v kontrolnem sevu (višje izražanje) (preglednica 30). Rezultati hibridizacij torej potrjujejo dejstva (Lipinska in sod., 1989; Strauch in sod., 1989; ter Seol in sod., 1991), da je proteaza Do oziroma serinska proteaza periplazme DegP potrebna za preživetje pri višjih temperaturah. Hkrati pa ne moremo mimo tega, da rezultati hibridizacij gena *sohB*, ki nosi zapis za proteazo SohB, kažejo, da je transport rekombinantnih proteinov skozi membrano otežen, kar vsaj posredno vpliva na akumulacijo proteinov v periplazemskem prostoru. Zato lahko sklenemo, da gena *sohB* in *degP* ne moreta neposredno vplivati na ravni akumulacije rekombinantnega proteina hG-CSF v citoplazmi, imata pa potencialno vlogo pri akumulaciji proteinov v periplazmi.

#### **5.1.4.2.3 Pri višjih temperaturah so ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za periplazemske proteaze, pretežno višje**

Rezultati hibridizacij genov, ki nosijo zapis za proteaze v periplazmi (preglednica 30), kažejo, da je v primeru gena *dacD*, ki nosi zapis za PBP-6B-D-alanil-D-alanin-karboksipeptidazo, ki je vezavni protein za penicilin (Baquero in sod., 1996) in za katero velja, da njena produkcija v zgodnji logaritemski fazi vodi do celične lize (Nelson in Young, 2001), prišlo do spremembe v ravneh izražanja (nižje izražanje) pri 42 °C glede na 25 °C le v primeru kontrolnega seva (preglednica 30). Pri vseh ostalih pogojih do sprememb v ravneh izražanja gena *dacD* ni prišlo. V primeru proteaze Do (kodira gen *degP*) pa je prišlo do spremembe v ravni izražanja (višje izražanje) gena *degP* prav tako le pri 42 °C glede na 25 °C le v primeru kontrolnega seva (preglednica 30). Pri vseh ostalih pogojih sprememb v ravni izražanja ni bilo.

Omenimo lahko še, da smo v primeru gena *ydcP*, ki nosi zapis za potencialno proteazo YdcP (informacij glede njene funkcije nismo zasledili), opazili spremembe v ravni izražanja (višje izražanje) pri 42 °C glede na 25 °C (le za produkcijski sev) (preglednica 30).

Kljud spremembam v ravneh izražanja genov, ki nosijo zapis za vse omenjene proteaze, njihovih funkcij delovanja nismo uspeli neposredno povezati s spremembami v ravni akumulacije rekombinantnih proteinov v periplazmi, še manj pa z ravnimi v citoplazmi.

#### **5.1.4.2.4 Celice, ki ne vsebujejo gena za proteazo Lon, izkazujejo zmanjšano možnost razgradnje rekombinantnih proteinov; OmpT je v neposredni povezavi z delovanjem šaperona SecB, na katerega vpliva GroEL**

Proteaza Lon (La) (kodira gen *lon*) ima glavno vlogo pri razgradnji velikega števila nepravilno zvitih in nestabilnih regulatornih proteinov. Celice brez gena za proteazo Lon izkazujejo zmanjšano možnost razgradnje različnih proteinov nepravilnih oblik in rekombinantnih proteinov. Te celice izkazujejo nenavadne fenotipe, kot sta sluzavost in povečana občutljivost za UV-svetlobo (Chin in sod., 1988). Po drugi strani pa celice z večjimi koncentracijami proteaze La izkazujejo hitrejšo možnost za razgradnjo proteinov nepravilnih oblik in nekaterih proteinov pravilnih oblik. Pomembno je tudi, da se koncentracija proteaze La poveča, ko celice nakopičijo velike količine proteinov nepravilnih oblik (npr. pri višjih temperaturah). Ta indukcija je tudi del odziva hsr, ki je pod nadzorom gena *htpR* (*rpoH*) (Chin in sod., 1988). Ker naš sev (sev BL21 (DE3) bakterije *E. coli* (Amersham Biosciences) za izražanje nosi delecijo gena *lon*, kar je razvidno tudi iz rezultatov hibridizacij (rezultati niso prikazani), saj nismo uspeli dobiti rezultatov za ravni izražanja gena *lon*, lahko sklenemo, da je v primeru, ko je vpliv proteaze Lon nevtraliziran, zmanjšana možnost razgradnje rekombinantnega proteina.

Sev bakterije *E. coli* BL21(DE3) nosi tudi delecijo gena *ompT* (Amersham Biosciences), ki nosi zapis za proteazo zunanje membrane OmpT, katere funkcija je razgradnja rekombinantnih proteinov. Znano je, da ima OmpT kot proteaza zunanje membrane izredno specifičnost za bazične proteinske ostanke (Sugimura in sod., 1988) in da je OmpT v neposredni povezavi z delovanjem šaperona SecB (del Sec-translokaze za transport skozi notranjo membrano) (Baars in sod., 2005), ki je citoplazemski protein, vpletен v sistem ločevanja proteinov prek sistema Sec (deloval naj bi v povezavi s kompleksom SecA/E/G/Y).

Rezultati hibridizacij (rezultati niso prikazani) kažejo, da sprememb v ravni izražanja genov *secA*, *secB* in *secY* pri 37 °C in 42 °C glede na 25 °C (za produksijski in kontrolni sev) ni bilo. Zato nismo mogli potrditi povezave delovanja šaperona SecB s tvorbo nkIT in posledično z akumulacijo rekombinantnega proteina hG-CSF.

#### 5.1.4.3 Sekundarna struktura mRNA faktorja $\sigma^{32}$ posredno vpliva na raven akumulacije rekombinantnega proteina hG-CSF

Rezultati hibridizacij (preglednica 31) kažejo na nespremenjene ravni v izražanju gena *rpoH* v odvisnosti od temperaturnih sprememb razen v primeru primerjave kontrolnega in produkcijskega seva bakterije *E. coli* pri 42 °C. Vidno je tudi zvišanje ravni izražanja nekaterih genov, ki so pod vplivom omenjenega faktorja sigma (rezultati niso prikazani). Ti rezultati so postali zanimivi za nadaljnje preučevanje. Po pregledu literature smo predpostavili, da je za zvišane ravni proteina hG-CSF v citoplazmi bakterije *E. coli* BL21 pri nižji temperaturi vseeno lahko odgovoren faktor sigma 32, ki ga kodira gen *rpoH*. Dokazano je bilo namreč, da ima mRNA gena *rpoH* izrazito stabilne sekundarne strukture pri zvišanih temperaturah in da znižanje temperature vpliva na gen *rpoH* tako, da destabilizira sekundarne strukture mRNA na ribosому, kar sprosti translacijo proteinov. Ob tem se aktivirajo tudi ribosomski proteini, ki delujejo kot RNA-šaperoni in spodbujajo nastanek katalitsko aktivne strukture ribocimov (Jones in sod., 1996).

## 5.2 SKLEPI

Namen doktorskega dela je bil razložiti vpliv različnih temperatur ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gojenja bakterije *E. coli* na izražanje genov, ki nosijo zapis za proteaze in šaperone, ter posredno na tvorbo neklašičnih inkluzijskih teles. Zato smo ugotavljal razlike v izražanju genov v produkcijskem in kontrolnem sevu BL21 (DE3) bakterije *E. coli*.

- Pri analizi izražanja genov z metodo mikromrež je bilo približno 13 % vseh genov statistično značilno različno izraženih, če smo primerjali kontrolni sev, gojen pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  glede na  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 %, če smo primerjali kontrolni sev, gojen pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  glede na  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ter po 3 %, če smo primerjali produkcijski sev, gojen pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ali  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  glede na  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Od vseh statistično značilno različno izraženih genov je bilo približno 44 % takih, ki smo jih lahko analizirali v diagramu metabolnih poti bakterije *E. coli*. Med njimi je bilo največ genov, ki so kazali spremembe v izražanju, povezanih z energetskim metabolizmom, z biosintezo aminokislin in nukleotidov ter kofaktorjev in sekundarnih metabolitov. Nekaj je bilo tudi takih, ki pripadajo skupini transporterjev ter proteinom, odgovornim za signalne poti. Skoraj vse spremembe (95 %) v ravni izražanja genov smo opazili le v primeru kontrolnih sevov (C37\_25 in C42\_25).
- Izražanje genov pri isti temperaturi, če smo primerjali kontrolni in produkcijski sev v diagramu metabolnih poti bakterije *E. coli*, je bilo najizrazitejše pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  smo z isto primerjavo kontrolnega in produkcijskega seva dobili statistično manj značilno različno izraženih genov. V povprečju smo uspeli pri vseh treh temperaturah na diagram metabolnih poti bakterije *E. coli* preslikati 45 % genov, ki so kazali spremembe v izražanju. Povezani so z metabolizmom energetskih poti, biosintezo aminokislin in nukleotidov ter kofaktorjev in sekundarnih metabolitov. Nekaj je bilo tudi takih, ki pripadajo skupini transporterjev ter proteinom, odgovornim za signalne poti.
- Izražanje genov pri isti temperaturi, če smo primerjali kontrolni in produkcijski sev, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze ali ostale s stresom povezane proteine, je bilo najizrazitejše pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  nam ista primerjava kontrolnega in produkcijskega seva ni dala niti enega gena, ki bi bil statistično značilno različno izražen. To kaže, da pri optimalni temperaturi produkcija rekombinantnih proteinov nima pomembnega vpliva na izražanje genov bakterije *E. coli*. Pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  so bili taki statistično značilno različno izraženi geni štirje.
- Med do zdaj znanimi geni, ki nosijo zapis za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine, jih je približno 20 % izkazovalo statistično značilne spremembe v izražanju. Največ sprememb smo opazili pri  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  glede na  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Z metodo qPCR smo ugotovljali izražanje 6 genov. Statistično značilno razliko v izražanju, ugotovljeno z mikromrežami, smo skoraj v celoti potrdili s statistično značilno razliko vrednosti, dobljenih z analizo qPCR. V tistih primerih, kjer tega nismo uspeli potrditi, pa se je pokazal isti trend izražanja genov.
- Z imunološko identifikacijo proteinov po prenosu Western (WB) smo želeli potrditi spremembe v ravni izražanja izbranega gena *groEL* še na proteinski ravni. Rezultati analiz proteina GroEL so potrdili rezultate hibridizacij mikromrež in qPCR izbranega gena *groEL* pri 37 °C oziroma 42 °C glede na 25 °C tako za produkcijski kot za kontrolni sev.
- Izražanje genov, ki nosijo zapis za pomembne šaperone, kot sta GroEL in DnaK, je bilo pričakovano višje pri zvišani temperaturi. Ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za faktorje sigma in ostale proteine Hsp ter regulatorje sigma pri različnih temperaturah pa so ostale skoraj nespremenjene. Ugotovili smo tudi, da je poleg šaperona UspE edina skupina šaperonov, ki ima povečano aktivnost izražanja genov pri 25 °C, skupina šaperonov, odgovornih za gibaljivost bakterije *E. coli*.
- Pri višjih temperaturah so bile ravni izražanja proteaz citoplazemske membrane nižje, pri proteazah periplazme pa višje.
- Dobili smo tudi posredne, vendar pomembne rezultate, ki kažejo na pomembno vlogo šaperona GroEL pri tvorbi neklašičnih inkluzijskih teles.
- Zanimivi so bili rezultati izražanja gena, ki nosi zapis za predvideno proteazo YaeL, saj je bilo izražanje gena *yaeL* pri 25 °C nižje, kar kaže na pomembno vlogo te proteaze pri produkciji rekombinantnih proteinov pri nižji temperaturi.
- Dobili smo vpogled v mehanizme produkcije rekombinantnih proteinov v bakteriji *E. coli* pri nižji temperaturi (25 °C), kar je potencialno uporabno tudi za produkcijo drugih proteinov (ne le hG-CSF), še posebno takih, ki se v biološko aktivno obliko lahko zvijejo spontano.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Protein hG-CSF ima funkcijo centralne, na nevtrofilcih osnovane imunske obrambe, saj ima regulatorno vlogo pri rasti, diferenciaciji, preživetju in aktivaciji nevtrofilcev in njihovih prekurzorjev. Predpisujejo ga za okrepitev imunskega sistema pri pacientih s HIV, pljučnico, sladkorno boleznijo, levkemijo in fibrilno nevtropopenijo. Za zdravljenje uporabljajo štiri oblike proteina hG-CSF; tj. neglikozilirano obliko z zamenjanimi petimi aminokislinami na N-koncu (nartograstim), glikozilirano obliko (lenograstim) in neglikozilirano obliko (filgrastim), ki jo najpogosteje proizvajajo v bakteriji *E. coli*, ter modificirano, pegilirano obliko hG-CSF (Neulasta® – pefilgrastim). Raziskovanje sinteze rekombinantnega proteina hG-CSF se je začelo že pred nekaj leti, ko je bilo z biosintezo pri nižji temperaturi (25 °C) dokazano, da se pri tej temperaturi tvorijo t. i. neklašična inkluzijska telesa (nkIT), v katerih je večji odstotek pravilno zvitega proteina hG-CSF (Jevševar in sod., 2005; Peternel in sod., 2008).

Osrednji namen doktorske disertacije je bil potrditi ali ovreči hipotezo, da bo pri nižji temperaturi (25 °C) izražanje genov, ki nosijo zapis za nekatere proteaze zmanjšano, pri čemer bodo novonastale molekule proteina hG-CSF manj podvržene proteolitični cepitvi. Pri višji temperaturi (42 °C) pa bo izražanje genov, ki nosijo zapis za nekatere proteaze večje, kar bo vplivalo na novonastale molekule proteina hG-CSF, saj bodo bolj nagnjene k proteolitični cepitvi, kar bo pomenilo nižje izplene tarčnega proteina. Sklepali smo tudi, da bomo pri nižji temperaturi identificirali nekatere gene (najverjetneje šaperone), ki sodelujejo pri pravilnem zvijanju proteinov.

Z metodama mikromrež in qPCR smo ugotavljali različno izražanje genov pri treh različnih temperaturah (tj. 25 °C, 37 °C in 42 °C) v kontrolnem in produkcijskem sevu. Pri tem smo opazovali razlike v izražanju genov med različnimi temperaturami, pa tudi med kontrolnim in produkcijskim sevom pri isti temperaturi.

Preučevane vzorce cDNA kontrolnih in produkcijskih sevov pri različnih temperaturah smo hibridizirali na mikromrežah ter jih nato optično brali z optičnim čitalnikom. Temu je sledila analiza podatkov s kvantilno normalizacijo in statističnimi preizkusmi, kot sta t-preizkus in preizkus ANOVA. Nadalje smo dobljene vrednosti analizirali z bioinformacijsko iniciativo GO (Gene Ontology), ki omogoča določitev bioloških in funkcionalnih značilnosti posameznih genov ter njihovih produktov med različnimi organizmi in podatkovnimi zbirkami. Da bi lažje biološko interpretirali rezultate, smo dobljena statistično značilna

izražanja genov preverili še z analizo po metodi GSEA. Dobili smo skupine genov, ki so se glede na temperaturne spremembe različno izrazili. Iz nabora vseh genov bakterije *E. coli* (približno 4.200 oz. 12.000 na mikromreži) jih je bilo povprečno kar 13 % statistično značilno različno izraženih, če smo primerjali kontrolne seve, gojene pri 37 °C in 25 °C, ter 10 %, če smo primerjali kontrolne seve pri 42 °C in 25 °C. V primeru produkcijskega seva smo dobili povprečno 3 % statistično značilno različno izraženih genov, če smo primerjali 42 °C ali 37 °C s 25 °C. Ugotovili smo, da je bilo izražanje genov pri isti temperaturi, če smo primerjali kontrolni in produkcijski sev, najizrazitejše pri 42 °C, kar smo opazili tudi pri primerjavah kontrolnih in produkcijskih sevov pri 42 °C glede na 25 °C. Nadalje smo ugotovili, da je bilo od vseh statistično značilno različno izraženih genov približno 44 % takih, ki smo jih lahko analizirali v diagramu metabolnih poti bakterije *E. coli*. Med njimi je največ genov, ki so kazali spremembe v izražanju, povezanih z metabolizmom energetskih poti, z biosintezo aminokislin in nukletidov ter kofaktorjev in sekundarnih metabolitov, predvsem pri izražanju kontrolnih sevov (C37\_25 in C42\_25).

Rezultati so še pokazali, da je bilo med geni, ki nosijo zapise za šaperone, proteaze in ostale s stresom povezane proteine, približno 70 % takih, ki so kazali statistično značilne spremembe v izražanju, kar nekaj pa je bilo tudi genov, ki so odražali spremembe v energetskem metabolizmu, biosintezi aminokislin in nukletidov ter kofaktorjev in sekundarnih metabolitov. Na diagram pregleda celičnih funkcij bakterije *E. coli* podatkovne zbirke EcoCyc smo lahko preslikali povprečno 44 % vseh statistično značilno različno izraženih genov.

Z metodo qPCR smo preverili izražanje 6 genov. Rezultate statistično značilne razlike izražanja genov, dobljenih z mikromrežami, smo skoraj v celoti potrdili s qPCR. Z imunološko identifikacijo proteinov po prenosu Western smo ugotovili, da rezultati prenosa Western izbranega proteina GroEL potrjujejo rezultate hibridizacij mikromrež in qPCR izbranega gena *groEL* pri 37 °C ali pri 42 °C glede na 25 °C tako za produkcijski kot za kontrolni sev.

Ugotovili smo tudi, da so bile ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za pomembne šaperone, kot sta GroEL in DnaK po pričakovanju višje pri zvišani temperaturi. Nekoliko pa so nas presenetile spremembe v ravni izražanja genov, ki nosijo zapis za faktorje sigma, saj sprememb skoraj ni bilo. Izstopali so tudi rezultati sprememb v ravni izražanja genov skupine šaperonov, odgovornih za gibeljivost bakterije *E. coli*, saj smo opazili njihovo povečano izražanje pri 25 °C.

Pri višjih temperaturah so bile spremembe v ravni izražanja genov, ki nosijo zapise za proteaze citoplazemske membrane, pretežno manjše, za proteaze periplazme pa pretežno večje. Prav

tako smo dobili posredne, vendar pomembne rezultate, ki kažejo na pomembno vlogo šaperona GroEL pri tvorbi neklašičnih inkluzijskih teles. Pomembni so še rezultati izražanja dveh genov, ki nosita zapis za proteazi YeaZ in YaeL, tj. genov *yeaZ* in *yaeL*. Izražanje gena *yeaZ* je bilo pri 25 °C nižje, izražanje gena *yaeL* pa je bilo pri 25 °C višje (primerjava med produksijskim in kontrolnim sevom), kar kaže na njuno pomembno vlogo pri produkciji rekombinantnih proteinov pri nižji temperaturi.

## 6.2 SUMMARY

The hG-CSF is central to neutrophil-based immune defense due to its regulatory role in the growth, differentiation, survival, and activation of neutrophils and their precursors. It can be used for treatment of HIV, pneumonia, diabetes, leukemia and fibrile neutropenia. Four types of hG-CSF are clinically available: glycosylated form (lenograstim) produced in CHO cells, an N-terminal mutated nonglycosylated form (nartograstim), and nonglycosylated form (filgrastim), both produced by using the expression in *E. coli*, and long acting version (PEGfilgrastim), a modified PEGylated filgrastim. It has already been reported that functional proteins could be easily extracted from inclusion bodies grown at lower temperatures. Such inclusion bodies were termed "non-classical" inclusion bodies (ncIBs) and are defined by containing a large amount of correctly folded protein precursor produced in *E. coli* at lower temperature (around 25°C) (Jevšev et al., 2005, Peternel et al., 2008).

The main aim of the doctoral dissertation was to test the hypothesis that at lower temperature (i.e. T = 25°C) the activity of a certain group of proteases will be lowered and the newly formed molecules of hG-CSF will be less vulnerable to proteolytic hydrolysis consequently while at elevated temperatures (i.e. T = 42°C) the activity of a certain group of proteases will be increased and the newly formed molecules of hG-CSF will be less vulnerable to proteolytic hydrolysis consequently. On the other hand, some genes (potentially chaperones) might be identified that contribute to proper protein folding at suboptimal growth temperatures.

Differential gene expression at three different temperatures (i.e. T = 25°C, 37°C and 42°C) considering a production and a control strain was studied using microarray analysis and qPCR. The same type of analysis was used when comparing changes in expression levels of genes between the control and the production strain at the same temperature.

cDNA samples obtained from control and production strain cultures grown at three different temperatures were first hybridized to oligonucleotide microarrays and then analyzed using

laser scanner. After quantile normalization, the data was analyzed using t-test. Additionally, two-way analysis of variance was performed to test for the effects of recombinant protein production and growth temperature as well as interaction of both factors. For easier biological interpretation functional analysis of gene expression changes was performed using GSEA. This led us to discovery of a number of genes that were significantly differentially expressed. Approximately 13 % of all genes showed statistically significant differences in expression levels if comparing control strain cultures grown at  $T = 37^{\circ}\text{C}$  and  $T = 25^{\circ}\text{C}$  and approximately 10 % if comparing control strain cultures grown at  $T = 42^{\circ}\text{C}$  and  $T = 25^{\circ}\text{C}$ . In production strain approximately 3 % of genes showed changes in expression levels at  $T = 37^{\circ}\text{C}$  or  $T = 42^{\circ}\text{C}$  compared to  $T = 25^{\circ}\text{C}$ , respectively. The identified differentially expressed genes in metabolic and regulatory pathways were inspected using

EcoCyc Omics Viewer. On average 44 % of differentially expressed genes were linked onto *E. coli* pathways diagram and the data on these was further functionally interpreted. Prominent changes in energy metabolism, in metabolism of amino acids and nucleotides, as well as in biosynthesis of cofactors and secondary metabolites were observed (if the culture was grown below its optimal temperature). Some differentially expressed genes were annotated as transporters. Also some signaling pathways related genes were identified as differentially expressed.

Genes that were significantly differentially expressed showed most changes at  $T = 42^{\circ}\text{C}$  if comparing production and control strain as it was true in the case of comparison between  $T = 42^{\circ}\text{C}$  and  $T = 25^{\circ}\text{C}$  with regard to control and production strain. If considering genes that code for chaperones, proteases and other stress related genes 70 % of them showed statistical significance in expression. Prominent changes in energy metabolism, in metabolism of amino acids and nucleotides, as well as in biosynthesis of cofactors and secondary metabolites were observed. On average 44 % of differentially expressed genes were linked onto *E. coli* pathways diagram.

Real-time PCR was used to monitor the expression of six genes. Statistical significance of results obtained by microarrays was in most samples confirmed by statistical significance of qPCR-detected differences in gene expression levels. For GroEL chaperone information on gene expression was complemented by protein accumulation data. The results of immunoblotting showed that GroEL protein content at all temperatures is in line with the results of microarray hybridizations and qPCR for both, control and production strain.

The differential expression levels of chaperones GroEL and DnaK were in line with expectations since they showed upregulation at elevated temperatures. Surprisingly, differences in expression levels of genes coding for sigma factors remained practically

unchanged. The only group of chaperones beside UspE with higher gene activity at  $T = 25^\circ\text{C}$  was the group of flagellum-specific chaperones.

If considering differential expression levels of proteases the results showed that at elevated temperatures cytoplasmic membrane proteases were in majority down-regulated whereas periplasm proteases were up-regulated. Interestingly however, the activity of hypothetical protease *yeaZ* gene was decreased at  $T = 25^\circ\text{C}$  and the activity of protease *yaeL* gene was increased at  $T = 25^\circ\text{C}$  in production strain when compared to control strain, which could be an important factor in protein interactions that might lead to different accumulation levels of recombinant proteins. Furthermore, at lower temperatures the levels of GroEL, albeit lower than at higher temperature, can be sufficient for more efficient folding of recombinant protein.

## 7 VIRI

- Ades S.E., 2004. Control of the alternative sigma factor  $\sigma^E$  in *Escherichia coli*.  
*Current Opinion in Microbiology*, 7: 157-162
- Alba B.M., Leeds J.A., Onufryk C., Lu C.Z., Gross C.A., 2002. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes & Development*, 16, 16: 2156-2168
- Arifuzzaman M., Maeda M., Itoh A., Nishikata K., Takita C., Saito R., Ara T., Nakahigashi K., Huang H-C., Hirai A., Tsuzuki K., Nakamura S., Altaf-Ul-Amin M., Oshima T., Baba T., Yamamoto N., Kawamura T., Ioka-Nakamichi T., Kitagawa M., Tomita M., Kanaya S., Wada C., Mori H. 2006. Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Research*, 16: 686-691
- Arsène F., Tomoyasu T., Bukau B., 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*.  
*International Journal of Food Microbiology*, 55, 1-3: 3-9
- Baars L., Ytterberg A.J., Drew D., Wagner S., Thilo C., van Wijk K.J., de Gier J.W., 2006. Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 15: 10024-10034
- Baebler Š, 2006. Izražanje genov pri občutljivi in odporni sorti krompirja (*Solanum tuberosum* L.) v zgodnjem odzivu na okužbo s krompirjevim virusom Y<sup>NTN</sup>. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 126 str.
- Baebler Š., Krečič-Stres H., Rotter A., Kogovšek P., Cankar K., Kok E.J., Gruden K., Kovač M., Žel J., Pompe-Novak M., Ravnikar M., 2009. PVY<sup>NTN</sup> elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 hours after inoculation. *Molecular Plant Pathology*, 10: 263-275
- Baird L., Lipinska B., Raina S., Georgopoulos C. L., 1991. Identification of the *Escherichia coli* sohB gene, a multicopy suppressor of the HtrA (DegP) null phenotype. *Journal of Bacteriology*, 173, 18: 5763-5770
- Baneyx F., 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 5: 411-421
- Baquero M.R., Bouzon M., Quintela J.C., Ayala J.A., Moreno F., 1996. dacD, an *Escherichia coli* gene encoding a novel penicillin-binding protein (PBP6b) with DD-carboxypeptidase activity. *Journal of Bacteriology*, 178, 24: 7106-7111
- Bertelsen E.B., Chang L., Gestwicki J.E., Zuiderweg E.R., 2009. Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 21: 8471-8476
- Bieniossek C., Schalch T., Bumann M., Meister M., Meier R., Baumann U., 2006. The

- molecular architecture of the metalloprotease FtsH. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103, 9: 3066-3071
- Bochkareva E.S., Solovieva M.E., Girshovich A.S., 1998. Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of *E.coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95, 2: 478-483
- Bondar A.N., del Val C., White S.H., 2009. Rhomboid protease dynamics and lipid interactions. Structure, 17, 3: 395-405
- Borukhov S., Severinov K., 2002. Role of RNA polymerase sigma unit in transcription initiation. Research in Microbiology, 153, 9: 557-562
- BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System.  
[http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=3.4.11.9](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.4.11.9) (27. mar. 2010): informacija o Xaa-Pro aminopeptidazi iz članka:
- Graham S.C., Lee M., Freeman H.C. in Guss J.M., 2003. An orthorhombic form of *Escherichia coli* aminopeptidase P at 2.4 Å resolution. Acta Crystallographica, D59: 897-902
- Butler J.D., Levin S.W., Facchiano A., Miele L., Mukherjee A.B., 1993. Amino acid composition and N-terminal sequence of purified cystine binding protein of *Escherichia coli*. Life Sciences, 52, 14: 1209-1215
- Calloni G., Chen T., Schermann S.M., Chang H-C, Genevaux P., Agostini F., Tartaglia G.G., Hayer-Hartl M., Hartl F.U., 2012. DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. Cell Reports, 1: 251–264
- Carrió M.M., Villaverde A., 2005. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. Journal of Bacteriology, 187: 3599-3601
- Carruthers M.D., Minion C., 2009. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 during heat shock. FEMS Microbiology Letters, 295, 1: 96-102
- Chatellier J., Hill F., Lund P.A., Fersht A.R., 1998. In vivo activities of GroEL minichaperones. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95: 9861-9866
- Chaudhry C., Farr G.W., Todd M.J., Rye H.S., Brunger A.T., Adams P.D., Horwich A.L., Sigler P.B., 2003. Role of the γ-phosphate of ATP in triggering protein folding by GroEL-GroES: function, structure and energetics. EMBO Journal, 22, 19: 4877-4887
- Cheng C-H in Lee W-C, 2010. Protein solubility and differential proteomic profiling of recombinant *Escherichia coli* overexpressing double-tagged fusion protein. Microbial Cell Factories, 63, 9: 1-13
- Chin D.T., Goff S.A., Webster T., Smith T., Goldberg A.L., 1988. Sequence of the *Lon* Gene in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 263, 24: 11718-11728
- Chuang S., Blattner F.R., 1993. Characterization of Twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 175, 16: 5242-5252

- Churchill G.A., 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 32: 490-495
- Combinatrix - DNA microarrays  
[http://www.combinatrix.com/tech\\_microarrays.htm](http://www.combinatrix.com/tech_microarrays.htm) (1. feb. 2010)
- CustomArray™ 12K Microarray: Hybridization and Imaging Protocol (PTL006)  
[http://www.combinatrix.com/docs/PTL006\\_00\\_12K\\_Hyb\\_Imaging.pdf](http://www.combinatrix.com/docs/PTL006_00_12K_Hyb_Imaging.pdf) (1. feb. 2010)
- Dartigalongue C., Loferer H., Raina S., 2001. EcfE, a new essential inner membrane protease: its role in the regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 20, 21: 5908-18
- Dharmadi Y., Gonzalez R., 2004. DNA Microarrays: Experimental Issues, Data Analysis, and Application to Bacterial Systems, *Biotechnology Progress*, 20, 5: 1309–1324
- Dougan D.A., Reid B.G., Horwitz A.L., Bukau B., 2002. ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Molecular Cell*, 9, 3: 673-683
- El-Samad H., Kurata H., Doyle J.C., Gross C.A., Khammash M., 2004. Surviving heat shock: Control strategies for robustness and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 8: 2736–2741
- Fayet O., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C., 1988. The groES and groEL Heat Shock Gene Products of *Escherichia coli* Are Essential for Bacterial Growth at All Temperatures. *Journal of Bacteriology*, 171, 3: 1379–1385
- Finn R.D., Orlova E.V., Gowen B., Buck M., van Heel M., 2000. *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures. *EMBO Journal*, 19, 24: 6833–6844
- Frieden C., Clark A.C., 1997. Protein folding: How the mechanism of GroEL action is defined by kinetics, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94: 5535–5538
- G-CSF protein.  
<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=G-CSF> (21. maj 2010)
- Gadgil M., Kapur V., Hu W.S., 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to temperature shift. *Biotechnology Progress*, 21: 689-699
- García-Fruitós E., González-Montalbán N., Morell M., Vera A., Ferraz R.M., Arís A., Ventura S., Villaverde A., 2005. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial Cell Factories*, 27, 4: 1-6
- Gene Ontology  
<http://www.geneontology.org> (14. apr. 2012)
- Gene Ontology Consortium, 2006. The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Research*, 34: Database issue
- Gibson K.E., Silhavy T.J., 2000. SprE Levels Are Growth Phase Regulated in a  $\sigma^S$  – Dependent Manner at the Level of Translation. *Journal of Bacteriology*, 182, 14: 4117–4120

- Gottesman S. 1996. Proteases and their targets in *E. coli*. Annual Review of Genetics 1996;30: 465-506
- Gragerov A., Nudler E., Komissarova N., Gaitanaris G.A., Gottesman M.E., Nikiforov V., 1992. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89, 21: 10341-10344
- Gram Negative Bacteria,  
<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462bh2008/462bhonorsprojects/462bhonors2001/taylor/nessmen.htm> (15. apr. 2012)
- Gruber T.M., Gross C.A., 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annual Review of Microbiology, 57: 441-466
- Guisbert E., Herman C., Lu C.Z., Gross C.A., 2004. A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. Genes & Development, 18, 22: 2812-2821
- Gustavsson N., Diez A., Nyström T., 2002. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. Molecular Microbiology, 43, 1: 107-117
- Handford J.I., Ize B., Buchanan G., Butland G.P., Greenblat J., Emili A., Palmer T., 2009. Conserved network of proteins essential for bacterial viability. Journal of Bacteriology, 191: 4701-4704
- Harcum S.W., Haddadin F.T., 2006. Global transcriptome response of recombinant *Escherichia coli* to heat-shock and dual heat-shock recombinant protein induction. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 33, 10: 801-814
- Harrison C.J., Hayer-Hartl M., Di Liberto M., Hartl F., Kuriyan J., 1997. Crystal Structure of the Nucleotide Exchange Factor GrpE Bound to the ATPase Domain of the Molecular Chaperone DnaK. Science, 276, 5311: 431-435
- Hartl F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature, 381: 571-579F
- Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M., 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature, 475: 324-332
- Helmann J.D., 2001. Sigma Factors in Gene Expression. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, 1-7  
[http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/genomics\\_course/SigmaFactorsEncyArticle.pdf](http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/genomics_course/SigmaFactorsEncyArticle.pdf)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.  
[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042557.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042557.pdf) (21. maj 2010)
- Hill C.P., Osslund T.D., Eisenberg D., 1993. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 90, 11: 5167-5171

- Huang K., Flanagan J.M. in Prestegard J.H., 1999.  
The influence of C-terminal extension on the structure of the "J-domain" in *E. coli* DnaJ.  
Protein Science, 8: 203-214
- Ichihara S., Beppu N., Mizushima S., 1984. Protease IV, a Cytoplasmic Membrane Protein of  
*Escherichia coli*, Has Signal Peptide Peptidase Activity. Journal of Biological Chemistry, 259, 15: 9853-9857
- Image Processing and Analysis in Java.  
<http://rsbweb.nih.gov/ij/> (21. maj 2010)
- Institute for Statistics and Mathematics  
<http://www.r-project.org/> (9. feb. 2010)
- Jalen Š., 2005. Vpliv pH gojišča na funkcionalnost proteina hG-CSF iz inkluzijskih teles  
bakterije *Escherichia coli*. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 92 str.
- Jeong H., Barbe V., Lee C.H., Vallenet D., Yu D.S., Choi S.H., Couloux A., Lee S.W., Yoon  
S.H., Cattolico L., Hur C.G., Park H.S., Segurens B., Kim S.C., Oh T.K., Lenski R.E.,  
Studier F.W., Daegelen P., Kim J.F., 2009. *Escherichia coli* (strain B/BL21-DE3)  
complete proteome. Journal of Molecular Biology, 394: 644-652  
<http://expasy.org/sprot/homap/ECOBD.html> (21. maj 2010): Genome sequences of  
*Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3)
- Jevševar S., 2007. Biosinteza rekombinantnih proteinov v bakteriji *E. coli* pri nizki  
temperaturi. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Kemijo in Kemijsko  
tehnologijo: 118 str.
- Jevševar S., Gaberc-Porekar V., Fonda I., Podobnik B., Grdadolnik J., Menart V., 2005.  
Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be  
extracted. Biotechnology Progress, 21, 2: 632-639
- Jevševar S., Palčič J., Jalen Š., Pavko A., 2007. Influence of the Media Composition on  
Behavior of pET Expression Systems. Acta Chimica Slovenica, 54: 360–365
- Jishage M., Iwata A., Ueda S., Ishihama A., 1996. Regulation of RNA polymerase sigma  
subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit  
under various growth conditions. Journal of Bacteriology, 178, 18: 5447-5451
- Jonasson P., Liljeqvist S., Nygren P.Å., Ståhl S., 2002. Genetic design for facilitated  
production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnology and  
Applied Biochemistry, 35: 91–105
- Jones P.G., Mitta M., Kim Y., Jiang W., Inouye M., 1996. Cold shock induces a major  
ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*.  
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93: 76-80

- Jubete Y., Maurizi M.R., Gottesman S., 1996. Role of the heat shock protein DnaJ in the Lon-dependent degradation of naturally unstable proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 48: 30798-30803
- Kanehara K., Ito K., Akiyama Y., 2002. YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes & Development*, 16: 2147-2155
- Korber P., Stahl J.M., Nierhaus K.H., Bardwell J.C., 2000. Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *EMBO Journal*, 19, 4: 741-748
- Kornblum J.S., Projan S.J., Moghazeh S.L., Novick R.P., 1988. A rapid method to quantitate non-labeled RNA species in bacterial cells. *Gene*, 63, 1: 75 – 85
- Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., Kornberg A., 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science*, 293, 5530: 705-708
- Kwon S., Kim S. in Kim E., 1996. Effects of Glycerol on β-lactamase production during High Cell Density Cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 12: 205-208
- Lange R., Hengge-Aronis R., 1994. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes & Development*, 13: 1600-1612
- Langklotz S., Baumann U., Narberhaus F., 2012. Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823: 40-48
- Laskowska E., Kuczyńska-Wiśnik D., Skórko-Głonek J., Taylor A., 1996. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. *Molecular Microbiology*, 22, 3: 555-571
- Lewin B., 1997. Genes VI. Oxford New York, Oxford University Press: 1260 str.
- Li Y., Zheng Z., Ramsey A., Chen L., 2010. Analysis of Peptides and Proteins in their binding to GroEL. *Journal of Peptide Science*, 16: 693-700
- Lipinska B., Fayet O., Baird L., Georgopoulos C., 1989. Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology*, 171, 3: 1574-1584
- Maegawa S., Ito K., Akiyama Y., 2005. Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochemistry*, 44, 41: 13543-13552
- Maruyama K., Tsuji K., Tanaka R., Yamada K., Kodera Y., Nakahata T., 1998. Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by nartograstim (N-terminal replaced granulocyte colony-stimulating factor) in normal volunteers. *Bone Marrow Transplantation*, 22, 4: 313-320
- Meyer A.S., Baker T.A., 2011. Proteolysis in the *Escherichia coli* heat shock response: A player at many levels. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 194-199

### Microarray Images Software

<http://webapps.combimatrix.com/customarray/customarrayHome.jsp> (8. feb. 2010)

Minamino T., Namba K.J., 2004. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7, 1-2: 5-17

Miot M., Betton J-M. 2004. Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microbial Cell Factories*, 3, 4: 1-13

Molecular cell biology, Proteases of *E. coli*.

<http://www.cf.ac.uk/biosi/staffinfo/ehrman/tools/proteases/allproteases.html> (14. apr. 2012)

Mullis K.B., 1990. Recombinant DNA technology and molecular cloning. *Scientific American*, 262: 36

[http://www.blackwellpublishing.com/allison/docs/sample\\_ch8.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/allison/docs/sample_ch8.pdf) (21. maj 2010)

Mulvey M.R., Switala J., Borys A., Loewen P.C., 1990. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172, 12: 6713-6720

Mytelka D.S., Chamberlin M.J., 1995. *Escherichia coli* fliAZY Operon. *Journal of Bacteriology*, 178: 24-34D

Nelson D.E., Young K.D., 2001. Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, 10: 3055–3064

Notley-McRobb L., King T., Ferenci T., 2002. *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *Journal of Bacteriology*, 184, 3: 806-811

Novy R., Morris B., 2001. Use of glucose to control basal expression in the pET System. *Innovations* 13: 8-10

Pathway Tools Omics Viewer

<http://biocyc.org/ECOLI/overview-expression-map> (15. feb. 2010)

Performance of 12000 Feature Oligonucleotide Microarray Manufactured by Electrochemical Synthesis of DNA.

<http://www.combimatrix.com/docs/12WhitePaper.pdf> (1. feb. 2010)

Petek M., Baebler Š., Kuzman D., Rotter A., Podlesek Z., Gruden K., Ravnikar M., Urleb U., 2010. Revealing fosfomycin primary effect on *Staphylococcus aureus* transcriptome: modulation of cell envelope biosynthesis and phosphoenolpyruvate induced starvation. *BMC Microbiology*, 10: 159

Peternel Š., Grdadolnik J., Gaberc-Porekar V., Komel R., 2008. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microbial Cell Factories*, 7:34

Peternel Š., Bele M., Gaberc-Porekar V., Menart V., 2006. Nonclassical inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 5, 1: 1-2

- Pierce S.E., Davis R.W., Nislow C., Giaever G., 2007. Genome-wide analysis of barcoded *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion mutants in pooled cultures. *Nature Protocols* 2, 2958 – 2974  
[http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n11/fig\\_tab/nprot.2007.427\\_F9.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n11/fig_tab/nprot.2007.427_F9.html) (22. maj 2010)
- Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M., 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67: 237-247
- Prutensky M., Hengge-Aronis R., 2002. The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for sigmaS proteolysis: implications for RssB regulation and signal transduction in sigmaS turnover in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 45, 6: 1701-1713
- Quackenbush J., Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., Dharap S., Gaspard R., Hughes J.E., Snetsrud E., Lee N., 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques*, 29, 3: 548-4, 556
- Raina S., Missiakas D., Baird L., Kumar S., Georgopoulos C., 1993. Identification and transcriptional analysis of the *Escherichia coli* htrE operon which is homologous to pap and related pilin operons. *Journal of Bacteriology*, 175, 16: 5009-5021
- Rajagopala S.V., Yamamoto N., Zweifel A.E., Nakamichi T., Huang H-K., Mendez-Rios J.D., Franca-Koh J., Boorgula M.P., Fujita K., Suzuki K-I., Hu J.C., Wanner B.L., Mori H., Uetz P., 2010. The *Escherichia coli* K-12 ORFeome: a resource for comparative molecular microbiology. *BMC Genomics*, 11: 470
- Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H. in Blattner F.R., 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 27: 3821-3835
- Riley M., Abe T., Arnaud M.B., Berlyn M.K.B., Blattner F.R., Chaudhuri R.R., Glasner J.D., Horiuchi T., Keseler I.M., Kosuge T., Mori H., Perna N.T., Plunkett III G., Rudd K.E., Serres M.H., Thomas G.H., Thomson N.R., Wishart D. in Wanner B.L., 2006. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005. *Nucleic Acids Research*, 34: 1-9
- Ron E.Z. in Segal G., 1999. Regulation of heat-shock response in bacteria. *Annals of the New York Academy of Science*, 851: 147-151
- Rosen R., Biran D., Gur E., Becher D., Hecker M., Ron E.Z. 2002. Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. *FEMS Microbiology Letters*, 207, 1: 9-12
- Ruiz N., Peterson C.N., Silhavy T.J., 2001. RpoS-dependent transcriptional control of sprE: regulatory feedback loop. *Journal of Bacteriology*, 183, 20: 5974-5981
- Schneider D., Duperchy E., Depyrot J., Coursange E., Lenski R.E., Blot M., 2002. Genomic comparisons among *Escherichia coli* strains B, K-12 and O157:H7 using IS elements as molecular markers. *BMC Microbiology*, 2, 18: 1-8

- Schuman W., Ferreira L.C., 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 3: 442-453
- Schuman W., 1995. Regulation of the heat shock response in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience*, 21, 2: 133–148
- Seol J.H., Woo S.K., Jung E.M., Yoo S.J., Lee C.S., Kim K.J., Tanaka K., Ichihara A., Ha D.B., Chung C.H., 1991. Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: its identity with the htrA gene product. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 176, 2: 730-736
- Seong I.S., Oh J.Y., Yoo S.J., Seol J.H., Chung C.H.I., 1999. ATP-dependent degradation of SulA, a cell division inhibitor, by the HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 456, 1: 211-214
- Sherman M.Y., Goldberg A.L., 1993. Heat shock of *Escherichia coli* increases binding of dnaK (the hsp70 homolog) to polypeptides by promoting its phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 8648-8652
- Strauch K.L., Johnson K., Beckwith J., 1989. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *Journal of Bacteriology*, 171, 5: 2689-2696
- Straus D. B.; William W., Gross A., Carol A.D., 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$ . *Nature*, 329, 6137: 348-351
- Stryer L., 1995. Biochemistry 4<sup>th</sup> edition, Stanford University: 1064 str.
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillete M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 15545-15550
- Sugimura K., Nishihara T., 1988. Purification, characterization, and primary structure of *Escherichia coli* protease VII with specificity for paired basic residues: identity of protease VII and OmpT. *Journal of Bacteriology*, 170, 12: 5625–5632
- Škulj M., 2006. Določanje števila kopij plazmidov v bakteriji *Escherichia coli*. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, oddelek za Biologijo: 104 str.
- Škulj M., Okršlar V., Jalen Š, Jevševar S., Slanc P., Štrukelj B., Menart V., 2008. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microbial Cell Factories*, 7, 6: 1-12
- Takayanagi Y., Tanaka K., Takahashi H., 1994. Structure of the 5' upstream region and the regulation of the rpoS gene of *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, 243, 5: 525-531
- Terpe K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 2: 211-222

### The cell structure

<http://www.cellsalive.com/cells/bactcell.htm> (14. apr. 2012)

### The dance of the chaperones

[http://www.mpg.de/5188655/key\\_player\\_protein\\_folding](http://www.mpg.de/5188655/key_player_protein_folding) (15. apr. 2012)

Thomas J.G., Baneyx F., 1998. Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In Vivo. *Journal of Bacteriology*, 180, 19: 5165–5172

Typass A. in Hengge R., 2006. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in  $\sigma^S$  promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 59, 3: 1037-1051

VanBogelen R.A., Neidhardt F.C., 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87, 15: 5589–5593

Vanz L.S.A., Renard G., Palma S.M., Chies J.M., Dalmora S.L., Basso L.A., Santos D.S. 2008. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factories*, 7, 13: 1-12

Ventura S., Villaverde A., 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *TRENDS in Biotechnology*, 24: 179-185

Villaverde M., Carrió M.M., 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*, 25: 1385-1395

Vozelj M., 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 551 str.

Watson A., Mazumder A., Stewart M., Balasubramanian S., 1998. Technology for microarray analysis of gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 6: 609-614

White-Ziegler C.A., Davis T.R., 2009. Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 191: 1106-1110

Wingfield P., Benedict R., Turcatti G., Allet B., Mermod J.J., DeLamarre J., Simona M.G., Rose P., 1988. Characterization of recombinant-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Biochemical Journal*, 256, 1: 213–218

Yang Y.H., Dudoit S., Luu P., Lin D.M., Peng V., Ngai J., Speed T.P., 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*, 30, 4: 1-10

Yang Y.H., Xiao Y., Segal M.R., 2004. Identifying differentially expressed genes from microarray experiments via statistic synthesis. *Bioinformatics*, 7: 1084-1093

Yoon S.H., Han M.J., Lee S.Y., Jeong K.J., Yoo J.S., 2003. Combined Transcriptome and Proteome Analysis of *Escherichia coli* during High Cell Density Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 7: 753-767

- Yoshimoto T., Murayama N., Honda T., Tone H., Tsuru D., 1988. Cloning and expression of aminopeptidase P gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of expressed enzyme. *Journal of Biochemistry*, 104, 1: 93-97
- Yura T., Tobe T., Ito K., Osawa T., 1984. Heat shock regulatory gene (*htpR*) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 6803-6807
- Zeng G., Ye S., Larson T.J., 1996. Repressor for the *sn*-Glycerol 3-Phosphate Regulon of *Escherichia coli* K-12: Primary Structure and Identification of the DNA-Binding Domain. *Journal of Bacteriology*, 178, 24: 7080-7089
- Zhao K., Liu M. in Burgess R.R., 2005. The Global Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Induced  $\sigma^{32}$  Protein Involves  $\sigma^{32}$  Regulon Activation Followed by Inactivation and Degradation of  $\sigma^{32}$  *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 18: 17758-17768

## ZAHVALA

Na začetku bi se rad zahvalil mentorici prof. dr. Kristini Gruden, ki me je s svojo izredno strokovnostjo, predanostjo k delu, idejnim vodenjem, vzpodbujanjem in pozitivno naravnostjo usmerjala na poti raziskovanja in reševanja nastalih strokovnih problemov.

Doc. Dr. Viktor Menart, velika zahvala gre tudi Vam, saj ste mi omogočili začetek moje strokovne poti.

Strokovnost, pripravljenost za pomoč in idejno vodenje so bili prisotni tudi pri delovni mentorici, dr. Špeli Baebler zato je tudi njej namenjena posebna zahvala.

Posebna zahvala gre tudi dr. Simoni Jevševar za vso strokovno pomoč in idejno vodenje še posebej na področju gojenja bakterije *E. coli* in analitike proteinov.

Najlepša hvala tudi članoma komisije prof. dr. Darji Žgur-Bertok in izr. prof. dr. Marku Dolinarju za strokoven pregled dela. Izr. prof. dr. Marku Dolinarju bi se še posebej zahvalil za temeljit pregled doktorske naloge in njegovo skrb za dosledno rabo slovenskega jezika.

Zahvala gre tudi prof. dr. Andreju Blejcu za strokovno pomoč pri kvantilni normalizaciji rezultatov hibridizacij mikromrež.

Prav posebej bi se rad zahvalil mag. Neži Turnšek in Katji Barle za pomoč pri pripravi vzorcev in analizah s qPCR, Špeli Jalen, Karmen Čerkić in Maruši Hafner za pomoč pri gojenju bakterije *E. coli* ter Mateji Skok za pomoč na področju analitike proteinov.

Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem podjetja Lek d.d., Nacionalnega inštituta za Biologijo, Kemijskega inštituta, in Centra za funkcionalno genomiko in biočipe Medicinske fakultete, ki so mi pri delu kakorkoli pomagali.

Zahvalil bi se tudi Nacionalnemu Inštitutu Biologije pod vodstvom prof. dr. Maje Ravnikar, ki me je v okviru programov P1-0340 in P4-0165 Slovenske raziskovalne agencije finančno podprt pri opravljanju eksperimentalnega dela. Zahvala gre tudi podjetju Sandoz Biofarmacevtika, ki me je pod vodstvom dr. Simone Jevševar prav tako finančno podprt pri opravljanju eksperimentalnega dela.

Hvala tudi družini za potrežljivost, še posebej Damjani, ki mi je na tej poti stala ob strani in me vzpodbujala.

## PRILOGE

**Priloga A:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* pri 37 °C in 25 °C v produksijskem sevu

**Appendix A:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* production strain at T = 37 °C and T = 25 °C

**Priloga B:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* pri 42 °C in 25 °C v produksijskem sevu

**Appendix B:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* production strain at T = 42 °C and T = 25 °C

**Priloga C:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* pri 37 °C in 25 °C v kontrolnem sevu

**Appendix C:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* control strain at T = 37 °C and T = 25 °C

**Priloga D:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* pri 42 °C in 25 °C v kontrolnem sevu

**Appendix D:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* control strain at T = 42 °C and T = 25 °C

**Priloga E:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* kontrolnega in produksijskega seva pri 25 °C

**Appendix E:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* control and production strain at T = 25 °C

**Priloga F:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* kontrolnega in produksijskega seva pri 37 °C

**Appendix F:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* control and production strain at T = 37 °C

**Priloga G:** Preglednica normaliziranih podatkov izražanja genov bakterije *E. coli* kontrolnega in produksijskega seva pri 42 °C

**Appendix G:** Excel table of normalized data of differentially expressed genes of *E. coli* control and production strain at T = 42 °C

**Priloga H:** Preglednica podatkov diferenčno izraženih genov bakterije *E. coli* kontrolnega in produksijskega seva glede na iniciativo GO (Gene Ontology)

**Appendix H:** Excel Table of differentially expressed transcripts functionally analysed according to Gene Ontology (GO)

Vse naštete priloge so v elektronski obliki v priloženem elektronskem mediju.