

# Περίληψη

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν μία ιδιαίτερος σημαντική και μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών η οποία εμπλέκεται σε ένα εύρος κυτταρικών λειτουργιών. Στους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς, το 20-30% των γονιδίων κωδικοποιεί για μεμβρανικές πρωτεΐνες, τονίζοντας έτσι τη μεγάλη τους σημασία. Συγκεκριμένα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, την κυτταρική σηματοδότηση και τη διατήρηση της κυτταρικής δομής. Επιπλέον, η σημαντικότητά τους διαφαίνεται από το γεγονός πως ένα μεγάλο ποσοστό μεμβρανικών πρωτεϊνών εμπλέκεται σε σοβαρές ασθένειες όπως η επιληψία, ο διαβήτης, η κυστική ίνωση, ο καρκίνος κ.α.

Όπως γίνεται κατανοητό, η γνώση της ακριβούς δομής και λειτουργίας τους, αποτελεί ύψιστη ανάγκη καθώς η εύρυθμη λειτουργία όλων των οργανισμών στηρίζεται κατά ένα πολύ μεγάλο βαθμό στις πρωτεΐνες αυτές. Η δομική και λειτουργική μελέτη τους απαιτεί σημαντικές ποσότητες απομονωμένης διαμεμβρανικής πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας. Όμως, η ιδιαίτερος χαμηλή συγκέντρωσή τους στους ενδογενείς ιστούς όπου και εδράζονται, καθιστά ιδιαίτερος δύσκολη την απομόνωσή τους σε μεγάλες ποσότητες. Συνεπώς, η απόκτησή τους προϋποθέτει την παραγωγή τους σε ετερόλογους οργανισμούς, όπως είναι τα βακτήρια, η ζύμη, τα κύτταρα εντόμων, τα κύτταρα θηλαστικών, καθώς και τα διαγονιδιακά ζώα.

Ο οργανισμός *Escherichia coli* χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με επιτυχία. Περίπου το 20% των κατατεθειμένων γνωστών δομών στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών (PDB) προέρχεται από παραγωγή τους στον συγκεκριμένο οργανισμό. Παρά την ύπαρξη όμως επιτυχημένων περιπτώσεων, η χρήση του *E. coli* παραμένει μία πρόκληση καθώς η προσπάθεια παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, τις περισσότερες φορές, οδηγεί σε υψηλά επίπεδα σοβαρής κυτταροτοξικότητας και σε πολύ χαμηλά επίπεδα παραγόμενης πρωτεΐνης.

Έχοντας ως στόχο την ανάπτυξη *E. coli* στελεχών με την ικανότητα να αντιμετωπίζουν τις προκλήσεις της ετερόλογης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, το εργαστήριό μας έχει κατασκευάσει δύο τροποποιημένα στελέχη, ονόματι *E. coli* SuptoxD και SuptoxR, τα οποία μπορούν και ανθίστανται στην υψηλή τοξικότητα που επιφέρει συχνά η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών και, ταυτοχρόνως, παράγουν αυξημένες ποσότητες, τόσο προκαρυωτικών όσο και ευκαρυωτικών, σωστά αναδιπλωμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, μέσω της υπερέκφρασης δύο μεμονωμένων γονιδίων του *E. coli*: του γονιδίου *djlA*, και του γονιδίου *rraA*, αντιστοίχως.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα βακτηριακά αυτά στελέχη, προβήκαμε στην εύρεση των κατάλληλων συνθηκών υπερέκφρασης των γονιδίων *djlA* και *rraA*, καθώς και των πλέον αποτελεσματικών καλλιεργητικών συνθηκών παραγωγής, οι οποίες θα βελτιστοποιούσαν την ήδη αυξημένη παραγωγή, σωστά ενσωματωμένων και αναδιπλωμένων,

διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Μετά την εύρεση των συνθηκών αυτών, οι οποίες οδήγησαν την ετερόλογη παραγωγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο βέλτιστο βαθμό, όχι μόνο σε επίπεδο πρωτεϊνικής ποσότητας, αλλά και ποιότητας, ακολούθησε πρωτεϊνική απομόνωση μέσω της οποίας διεπιστώθη πως οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες, παρήχθησαν σε πολύ υψηλές ποσότητες (της τάξεως των μιλιγραμμαρίων (mg)) ποσότητα η οποία ικανοποιεί τις απαιτήσεις για περαιτέρω μελέτες. Επιπλέον, η χρήση των βελτιστοποιημένων στελεχών SuptoxD και SuptoxR οδήγησε στην επιτυχή παραγωγή αυξημένων επιπέδων βιολογικώς ενεργής πρωτεΐνης, και συνεπώς κατάλληλης για λειτουργικές μελέτες.

Εν συνεχεία, διερευνήσαμε αν φυσικά απαντώμενες, ομόλογες πρωτεΐνες της *E. coli* DjlA, μπορούν να έχουν παρόμοιες ευεργετικές ιδιότητες με το στέλεχος SuptoxD (*E. coli* DjlA) και, επιπροσθέτως, αν κάποια εξ αυτών δρα ακόμα πιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας, και στην παραγωγή ακόμα πιο αυξημένης ποσότητας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συγκριτικά με το στέλεχος 1<sup>ns</sup> γενιάς SuptoxD. Έχοντας αναζητήσει και βρει ομόλογες, της *E. coli* DjlA, πρωτεΐνες οι οποίες παρουσίαζαν χαμηλά, μεσαία και υψηλά επίπεδα ομοιότητας με αυτή, ακολούθησε συγκριτική μελέτη τους. Καθώς διαπιστώθηκε πως η πλειοψηφία των DjlA πρωτεϊνών διακρίνονταν από την ικανότητα να αντιμετωπίζουν την επαγόμενη κυτταροτοξικότητα, και κάποιες εξ αυτών να ξεχωρίζουν για την επιτυχή παραγωγή σωστά ενσωματωμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε αυξημένες ποσότητες, επιλέχθηκε η πρωτεΐνη DjlA που προερχόταν από τον οργανισμό

*Salmonella enterica*, η οποία ξεπερνούσε τις ήδη υψηλές αποδόσεις της *E. coli* DjlA. Χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αυτή, δημιουργήθηκε το στέλεχος 2<sup>ns</sup> γενιάς, SuptoxD2.0. Η χρήση του στελέχους αυτού απέφερε εξαιρετικά υψηλές ποσότητες διαμεμβρανικής ενεργής πρωτεΐνης, υψηλής ποιότητας, σε αναδιπλωμένη και μη συσσωματωμένη μορφή, καθιστώντας το ως ιδανικό σύστημα ετερόλογης παραγωγής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως από την κοινότητα της βιοτεχνολογίας.