

Περίληψη διδακτορικής διατριβής

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

Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί έναν από τους ιστορικά προτιμώμενους οργανισμούς-ξενιστές για την παραγωγή ανασυνδυασμένων υδατοδιαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ωστόσο, η βακτηριακή υπερέκφραση μεμβρανοπρωτεϊνών συνοδεύεται συχνά από φαινόμενα έντονης τοξικότητας και χαμηλής παραγωγικότητας

που οδηγούν σε χαμηλά επίπεδα τελικής βιομάζας και μειωμένη συσσώρευση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε αυτή την κατεύθυνση, στο παρελθόν κατασκευάστηκε ένα βακτηριακό στέλεχος, το SuptoxR, το οποίο υπερεκφράζει την RgaA, μια πρωτεΐνη-αναστολέα της αποδομητικής δράσης της RNάσης E του *E. coli*, και ανθίσταται στην κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα παράγει σημαντικά αυξημένες ποσότητες ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, κατασκευάστηκε μια σειρά νέων βακτηριακών στελεχών με βάση το SuptoxR.

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

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε το κατά πόσο βακτηριακά στελέχη που εκφράζουν παραλλαγές της RNάσης E, από την οποία έχουν απαλειφθεί τμήματα της C-τελικής της περιοχής και έχουν μειωμένη ριβονουκλεολυτική ικανότητα, μπορούν επίσης να ενισχύσουν την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε σύγκριση με κύτταρα που εκφράζουν την αγρίου τύπου ενδονουκλεάση, με τρόπο που προσομοιάζει τις συνθήκες υπερέκφρασης του αναστολέα της, της RraA. Ορισμένα από τα στελέχη που μελετήθηκαν και εξέφραζαν συγκεκριμένες γενετικές απαλοιφές, αύξησαν σημαντικά την απόδοση της υπερέκφρασης ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών, ενώ το βακτηριακό στέλεχος που έφερε την συγκεκριμένη μεταλλαγή RneΔ22, βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό καθώς αυξάνει σημαντικά τα τελικά επίπεδα ανάπτυξης της καλλιέργειας και ταυτόχρονα ενισχύει τη συσσώρευση ενός εύρους ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών προκαρυωτικής και ευκαρυωτικής προέλευσης, ξεπερνώντας σε αποδόσεις τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την παραγωγή τέτοιων πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, και σε αναλογία με το αρχικό *E. coli* στέλεχος SuptoxR, το στέλεχος που εκφράζει τη συγκεκριμένη παραλλαγή της RNάσης E, ονομάστηκε SuptoxRNE22. Συνολικά, τα τρία νέα στελέχη που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη μπορούν να αποτελέσουν βιοτεχνολογικά εργαλεία ευρείας εφαρμογής για την παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποδοτικά στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων μεμβρανικών πρωτεϊνών καλής ποιότητας, κατάλληλων για περαιτέρω βιοχημικές και δομικές μελέτες.

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