**SUPTOXR & SUPTOXR2.0: ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ**

**Ε. Βασιλοπούλου1,2, Α. Γιαννακοπούλου1, Χ. Καψάλης1, Μ. Μίχου1,2, Α. Μίχογλου-Σεργίου1, Φ.Ν. Κολίσης3, Γ. Σκρέτας1\***

1Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα 11635, Ελλάδα

2Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα 41500, Ελλάδα

3Σχολή χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα 15780, Ελλάδα

\*[*gskretas@eie.gr*](mailto:gskretas@eie.gr)

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν βασικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών, όπου επιτελούν εξαιρετικά σημαντικές λειτουργίες όπως η διατήρηση της δομικής ακαιραιότητας της μεμβράνης, η μεταγωγή σημάτων κ.α. Ο σημαντικός τους ρόλος υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κωδικοποιούνται από το 20-30% του συνόλου των γονιδίων. Λόγω της καίριας θέσης και των πολλαπλών λειτουργιών τους, αποτελούν περισσότερους από τους μισούς γνωστούς στόχους για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για πρόσβαση σε σημαντικές ποσότητες μεμβρανοπρωτεϊνών προκειμένου να επιτευχθεί ο λεπτομερής δομικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός τους, και ως εκ τούτου να διευκολυνθεί η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών προϊόντων που στοχεύουν σε μέλη αυτής της κατηγορίας πρωτεϊνών. Καθώς οι ποσότητες των μεμβρανοπρωτεϊνών που απαντώνται στη φύση είναι ιδαίτερα μικρές, οι απαιτούμενες ποσότητες είθισται να παράγονται ετερόλογα σε οργανισμούς-ξενιστές όπως τα βακτήρια *Escherichia coli* (*E. coli*). Ωστόσο, η ετερόλογη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια συνοδεύεται συχνά από την εμφάνιση σοβαρής κυτταροτοξικότητας, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη τη χρήση τους. Σε προηγούμενη εργασία λοιπόν, κατασκευάσαμε ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *E. coli*, το SuptoxR, το οποίο υπερεκφράζει το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RraA, η οποία ρυθμίζει τη δράση της RNάσης Ε του *E. coli*, να αποδομεί το mRNA. Το στέλεχος αυτό, αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην καταστολή της τοξικότητας που δημιουργείται συχνά κατά τη διαδικασία της βακτηριακής υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει σημαντικά τη συσσώρευση ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε ένα σύνολο ομόλογων RraA πρωτεϊνών από βακτήρια και φυτά, ως προς την ικανότητά τους να καταστέλλουν την επαγόμενη τοξικότητα, και να ενισχύουν τα επίπεδα παραγωγικότητας ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην εύρεση αρκετών ομόλογων RraA πρωτεϊνών που δρουν ως αποτελεσματικοί καταστολείς και ενισχυτές, και επιπλέον εντοπίστηκαν ορισμένες RraA οι οποίες είναι ικανές να ενισχύουν την βακτηριακή παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών πιο αποτελεσματικά από την RraA του *E. coli* του στελέχους SuptoxR. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, αναπτύξαμε βακτηριακά στελέχη δεύτερης γενιάς, τα SuptoxR2.0, τα οποία μπορούν να επιτύχουν ακόμη πιο βελτιωμένα επίπεδα παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στο *E .coli*.

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