

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μεταπτυχιακής ειδίκευσης μελετήθηκε περαιτέρω η συμβολή των πολυαμινών στη θετική ρύθμιση που ασκεί το σύστημα μετάδοσης σήματος δύο συστατικών AtoS-AtoC/Az στη βιοσύνθεση του πολυ-(R)-3-υδροξυβουτυρικού οξέος στο *E. coli*.

Το σύστημα AtoS-AtoC/Az επάγεται από το ακετοξικό οξύ και ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή του οπερονίου *atoDAEB* που κωδικοποιεί τα ένζυμα καταβολισμού λιπαρών οξέων με μικρή αλυσίδα. Ο ρυθμιστής απόκρισης AtoC/Az του συστήματος επάγεται από τις πολυαμίνες και αποτελεί το μη συναγωνιστικό αναστολέα Az της Αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, του ενζύμου κλειδί για τη βιοσύνθεση των πολυαμινών. Ο σημαντικός ρόλος των πολυαμινών για την ανάπτυξη και τη λειτουργία του κυττάρου, από τη στιγμή που συμμετέχουν στις περισσότερες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου, είναι πανθομολογούμενος. Πρόσφατα, αποδόθηκαν νέοι ρόλοι στο AtoS-AtoC/Az στο *E. coli* K-12. Η συμμετοχή του στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του cPHB, του μοναδικού μέλους της οικογένειας των πολυυδροξυαλκανοϊκών οξέων που βιοσυντίθεται στο *E. coli*, είναι ο νέος ρόλος του AtoS-AtoC/Az. Η σπερμιδίνη, επίσης, προκαλεί ενίσχυση των ποσών του cPHB, μόνο σε στελέχη που εκφράζουν του σύστημα AtoS-AtoC/Az. Η N⁸-ακετυλοσπερμιδίνη ενισχύει τα ποσά του cPHB κατά την υπερπαραγωγή του AtoS-AtoC/Az σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με τη σπερμιδίνη. Το cPHB χαίρει της απόδοσης πολλών φυσιολογικών ρόλων στο κύτταρο, μεταξύ των οποίων η συμμετοχή στην ομοιόσταση του ασβεστίου κατά το σχηματισμό καναλιών ασβεστίου στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες του βακτηρίου, η ανάπτυξη της επιδεκτικότητας των κυττάρων για γενετικό μετασχηματισμό, η προστασία των συμπλοκοποιημένων με αυτό πρωτεϊνών από πρωτεολύσεις και η συμμετοχή στην οργάνωση του DNA.

Διευκρινίστηκε, αρχικά, η απαίτηση έκφρασης του ολοκληρωμένου συστήματος AtoS-AtoC/Az κατά την παρουσία της σπερμιδίνης για την αυξημένη βιοσύνθεση του cPHB στο *E. coli*. Τα μετρούμενα με HPLC ποσά

του cPHB, έδειξαν ότι η εξωχρωμοσωμική εισαγωγή υψηλού αριθμού αντιγράφων της κινάσης AtoS, σε *ΔatoSC* κύτταρα δε συμπλήρωσε το φαινότυπο *ΔatoSC* ως προς τη βιοσύνθεση του cPHB, ακόμη και κατά την παρουσία της σπερμιδίνης, διατηρώντας τα επίπεδα βιοσύνθεσης του cPHB μειωμένα σε σχέση με τα *atoSC⁺* κύτταρα. Η αύξηση των ενδοκυττάρων ποσών μόνο της κινάσης διατήρησε τα βασικά επίπεδα συσσώρευσης ακόμη και στα *atoSC⁺* κύτταρα, κατά την παρουσία της πολυαμίνης, χωρίς να είναι ικανή να προκαλέσει τη θετική ρύθμιση της βιοσύνθεσης του cPHB που παρατηρείται υπό συνθήκες αύξησης των ενδοκυττάρων επιπέδων των πρωτεϊνών του συστήματος AtoS-AtoC/Az κατά 50-100 φορές σε σχέση με τα βασικά επίπεδα έκφρασης. Επιπλέον, *in trans* εισαγωγή μόνο του ρυθμιστή απόκρισης AtoC/Az του συστήματος στα *ΔatoSC* κύτταρα οδήγησε σε περιορισμένη ενίσχυση του cPHB κατά την παρουσία της πολυαμίνης, χωρίς όμως να συμπληρώσει το *ΔatoSC* φαινότυπο. Όμοια αύξηση, σε χαμηλότερα όμως επίπεδα, από τα αντίστοιχα κατά την υπερπαραγωγή του συνόλου του συστήματος AtoS-AtoC/Az παρατηρήθηκε και στα *atoSC⁺* κύτταρα.

Η βιοσύνθεση του cPHB ρυθμίζεται θετικά από το AtoS-AtoC/Az μέσω της μεταγραφικής του επίδρασης στο οπερόνιο *atoDAEB* κατά την επαγωγή του από τη σπερμιδίνη, από τη στιγμή που η εξωχρωμοσωμική εισαγωγή του συστήματος AtoS-AtoC/Az στα *ΔatoSC* κύτταρα χωρίς την παρουσία του λειτουργικού οπερονίου *atoDAEB*, δεν αποκατέστησε τα μειωμένα τα επίπεδα του cPHB στα βασικά ποσά που συσσωρεύονται στα *atoSC⁺* κύτταρα κατά την προσθήκη σπερμιδίνης.

Διευκρινίστηκε, επιπλέον, ο ρόλος της μετάδοσης σήματος, με τη μορφή της φωσφορυλίωσης του ρυθμιστή απόκρισης του συστήματος, προς τη θετική ρύθμιση της βιοσύνθεσης του βιοπολυμερούς. Η εισαγωγή μεταλλάξεων στις πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης του AtoC/Az, μείωσαν ή κατάργησαν την επαγωγή του cPHB. Η απαίτηση φωσφορυλίωσης του ρυθμιστή απόκρισης μελετήθηκε τόσο κατά την παρουσία της σπερμιδίνης όσο και κατά την παρουσία του ακετοξικού οξέος, του μοναδικού μέχρι σήμερα γνωστού επαγωγέα του συστήματος. Ο βαθμός επίδρασης των μεταλλάξεων

D55G και H73L στη συσσώρευση του cPHB κατά την επαγωγή με ακετοξικό, ήταν αντίστροφος σε σχέση με το βαθμό επίδρασής τους στην έκφραση του οπερονίου *atoDAEB*, όπως επίσης και κατά την προσθήκη της σπερμιδίνης στο θρεπτικό μέσο, με τη μετάλλαξη της Ιστιδίνης να προκαλεί σημαντικότερη μείωση των αυξημένων ποσών του cPHB κατά την υπερπαραγωγή της άγριου τύπου πρωτεΐνης, σε σχέση με τη μετάλλαξη του Ασπαραγινικού. Η εισαγωγή και των δύο *AtoC/Az* μεταλλάξεων, οδήγησαν σε μείωση των ποσών του cPHB στα βασικά επίπεδα, αίρωντας το φαινότυπο κατά την υπερπαραγωγή του *AtoS-AtoC/Az* συστήματος.

Η τροποποίηση των ενδοκυττάρων ποσών του συστήματος μετάδοσης σήματος *AtoS-AtoC/Az* στα κύτταρα *E. coli*, τροποποίησε την εντόπιση του βιοπολυμερούς μεταξύ των μεμβρανών και του κυτταροπλάσματος των κυττάρων, σε σχέση με τα βασικά επίπεδα βιοσύνθεσης και εντόπισής του. Η τροποποίηση αυτή εξαρτάται από το σήμα (ακετοξικό ή σπερμιδίνη) που αναγνωρίζεται και επάγει τη μετάδοση σήματος. Το ακετοξικό οξύ οδήγησε το cPHB ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης των κυττάρων αρχικά στις μεμβράνες και στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα, ενώ η σπερμιδίνη προκάλεσε συσσώρευση στις μεμβράνες των κυττάρων, όπου και εξακολούθησε να εντοπίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό, με ένα ενδιάμεσο διάστημα αύξησης των κυτταροπλασματικών ποσών του cPHB.