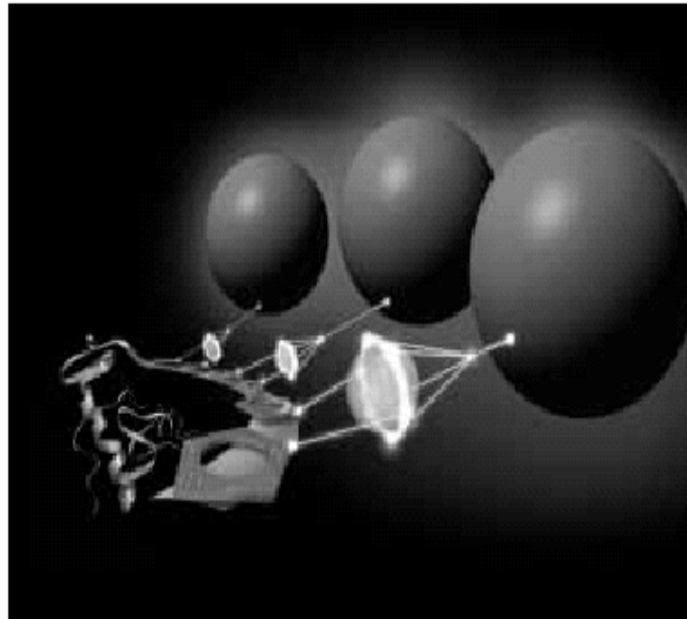
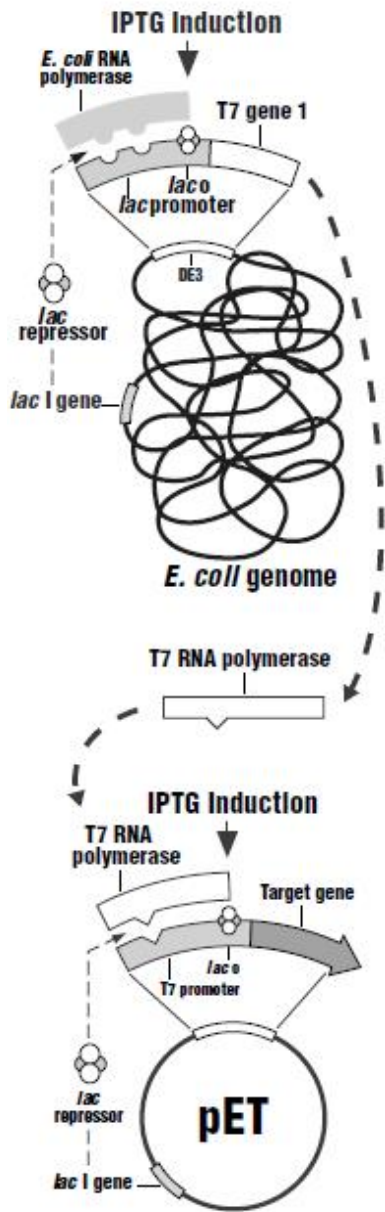


Expresa a purifikace rekombinantních protein



Radka Dopitová



Rekombinantní proteiny

Rekombinantní DNA je arteficiální DNA sekvence, která vznikla novou kombinací různých DNA sekvencí.

Rekombinantní proteiny jsou proteiny získané vnesením rekombinantní DNA do heterologního hostitele (např. mikroorganismus, kvasinky), ve kterém dojde k expresi genu.

Využití rekombinantních protein

Nadprodukce a purifikace rekombinantních protein jsou nezbytným předpokladem pro:

É **Biochemickou funkcí charakteristiku proteinu** (určení přesných kinetických parametrů K_m , k_{cat} pro enzymy se substrátem, K_i pro enzymy s inhibítorem, K_d pro protein - proteinové interakce i ligand -proteinové interakce)

É **Strukturální analýzu** (NMR, krystalografie)

É **Proteinové inženýrství** (zlepšení vlastností proteinů o aktivita, stabilita)

É **V průmyslovém měřítku jsou produkovány léky, vakcíny a potravinové doplňky.**

Cíl: Vysoký výtěžek homogenního proteinu (mg o kg proteinu)

Zachování biologické aktivity

Pro výrobu rekombinantní proteiny?

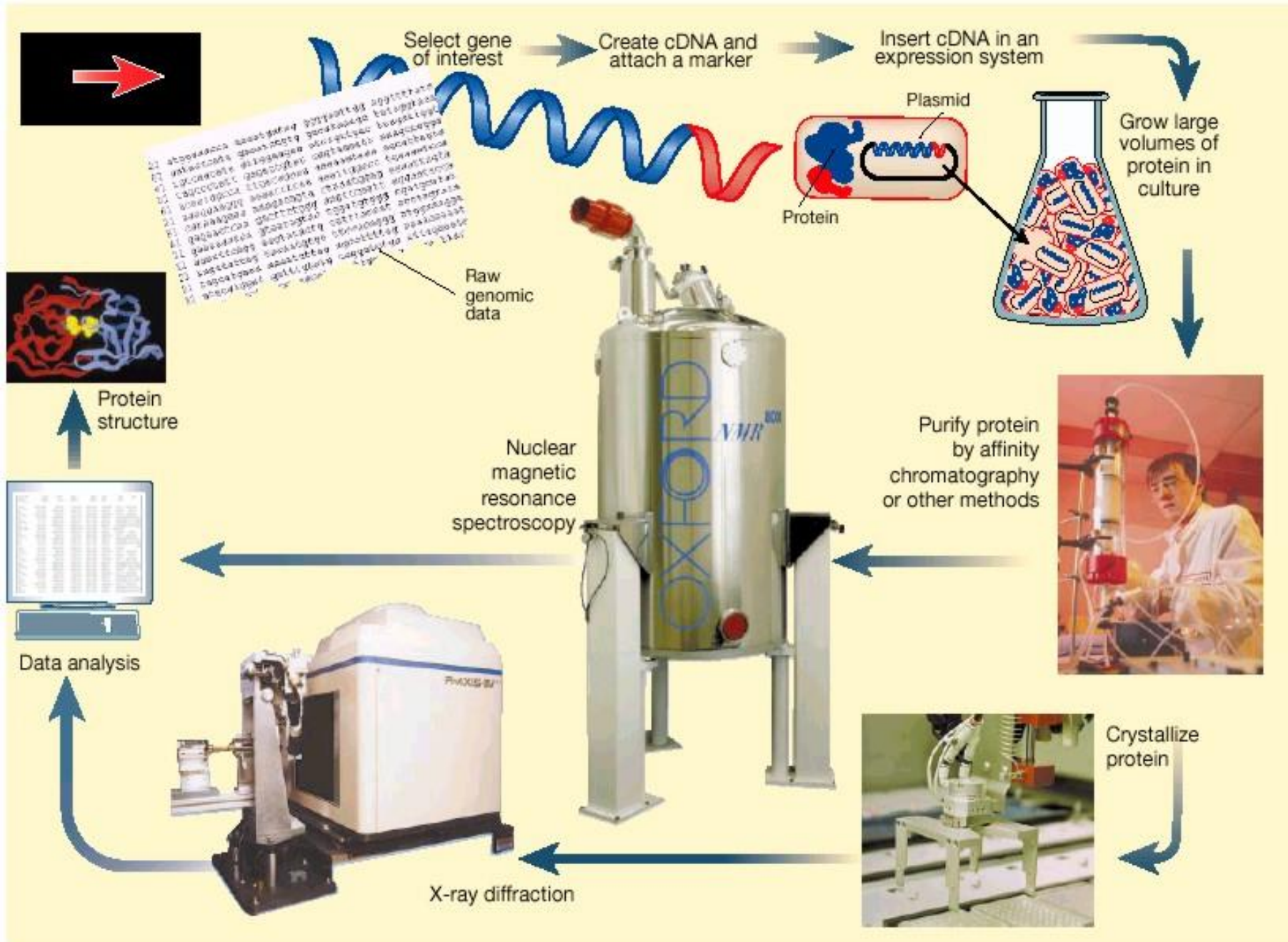
- Přirozený zdroj:** É Obtížná se získává (tkáně, orgány).
É Obtížná se kultivuje (bakterie, viry, tkáňové kultury).
É Limitovaná exprese
É Často obtížná purifikace proteinu

TABLE 1.2. Examples of low-abundance proteins and peptides isolated from natural biological sources

Protein	Source	Yield (µg)	Reference
Multipotential colony-stimulating factor	pokeweed mitogen-stimulated mouse spleen-cell-conditioned medium (10 liters)	1	Cutler et al. (1985)
Human A33 antigen	human colon cancer cell lines (10 ¹⁰ cells)	2.5	Catimel et al. (1996)
Platelet-derived growth factor (PDGF)	human serum (200 liters)	180	Heldin et al. (1981)
Granulocyte-colony-stimulating growth factor (G-CSF)	mouse lung-conditioned medium (3 liters)	40	Nicola et al. (1983)
Granulocyte-macrophage colony-stimulating growth factor (GM-CSF)	mouse lung-conditioned medium (3 liters)	12	Burgess et al. (1986)
Coelenterate morphogen	sea anemone (200 kg)	20	Schaller and Bodenmuller (1981)
Peptide YY (PYY)	porcine intestine (4000 kg)	600	Tatemoto (1982)
Tumor necrosis factor (TNF)	HL60 tissue culture medium (18 liters)	20	Wang and Creasy (1985)
Murine transferrin receptor	NS-1 myeloma cells (10 ¹⁰ cells)	20	van Driel et al. (1984)
Fibroblast growth factor (FGF)	bovine brain (4 kg)	33	Gospodarowicz et al. (1984)
Transforming growth factor-β (TGF-β)	human placenta (8.8 kg)	47	Frolik et al. (1983)
Human interferon	human leukocyte-conditioned medium (10 liters)	21	Rubinstein et al. (1979)
Muscarinic acetylcholine receptor	porcine cerebrum (600 g)	6	Haga and Haga (1985)
β ₂ -adrenergic receptor	rat liver (400 g)	2	Graziano et al. (1985)

Adapted, with permission, from Simpson and Nice (1989).

Technologie rekombinantních protein



Hostitelský organismus pro expresi rekombinantních protein

É Bakterie

É Kvasinky

É Rostliny

É Sav í bu ky

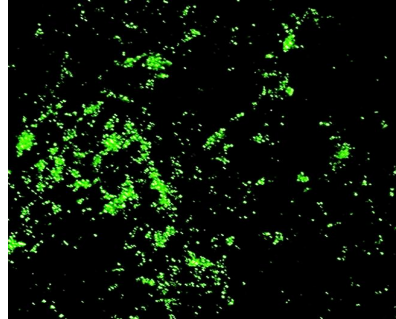
É Hmyzí bu ky s bakuloviry

É Transgenní flivo ichové

É Exprese proteinu in vitro

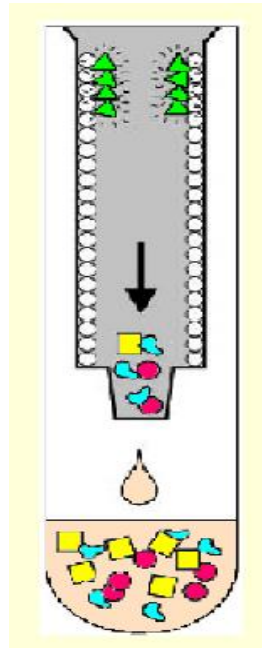
Obsah přednášky

1. část: Expresce rekombinantních proteinů v *E.coli*



Expresce proteinů fúzovaných s GFP v *E. coli*

2. část: Purifikace rekombinantních proteinů



Purifikace proteinů fúzovaných s GFP pomocí hydrofóbní matrice

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

VÝHODY :

ÉVysoká produkce rekombinantních proteinů

ÉDobře prostudovaný genom a proteom-usnadnění genových manipulací

ÉDesign vektorů usnadňuje klonování a expresi cizích genů

ÉRychlý růst v poměrně levném médiu

ÉPřizpůsobivost systému

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

NEVÝHODY:

É Potřeba cDNA zkoumaného proteinu

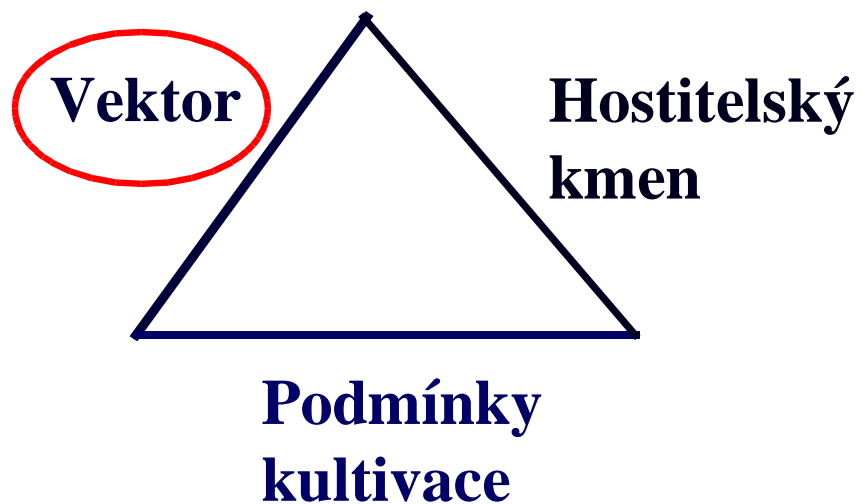
É Absence eukaryotických posttranslačních systémů (posttranslační modifikace)

É Tvorba nerozpustných inkluzních tělísek

É Omezená schopnost tvorby disulfidických vazeb

É Chybí sekreční mechanismus pro účinné uvolnění proteinu do kultivačního média

Expresní systém pro produkci rekombinantních protein v *E.coli*



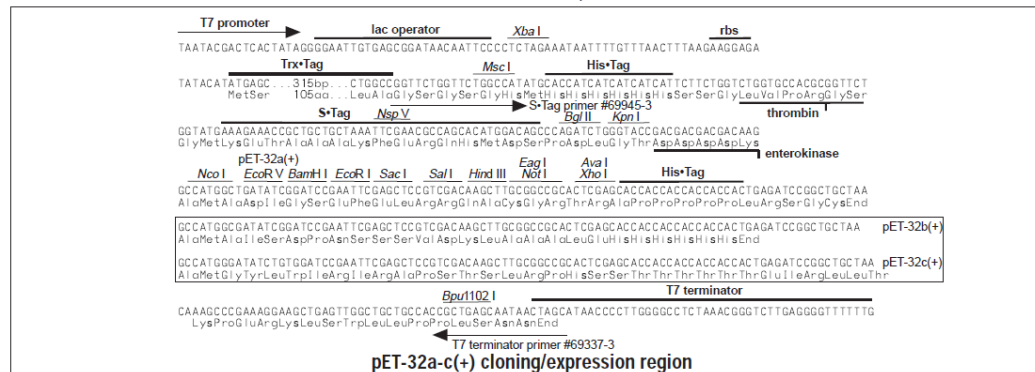
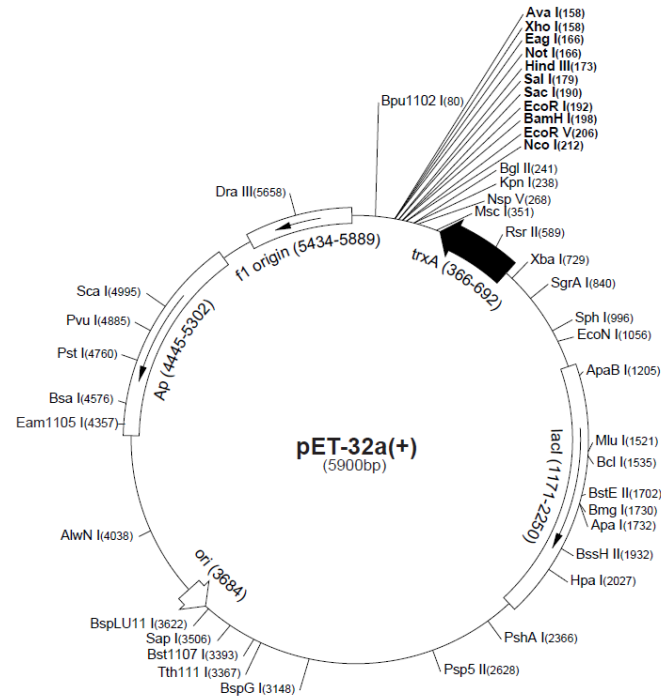
Expresní vektor

= klonovací vektor, který obsahuje nezbytné regulační sekvence k tomu, aby podporoval expresi inzerovaných cizích genů.

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Not</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.

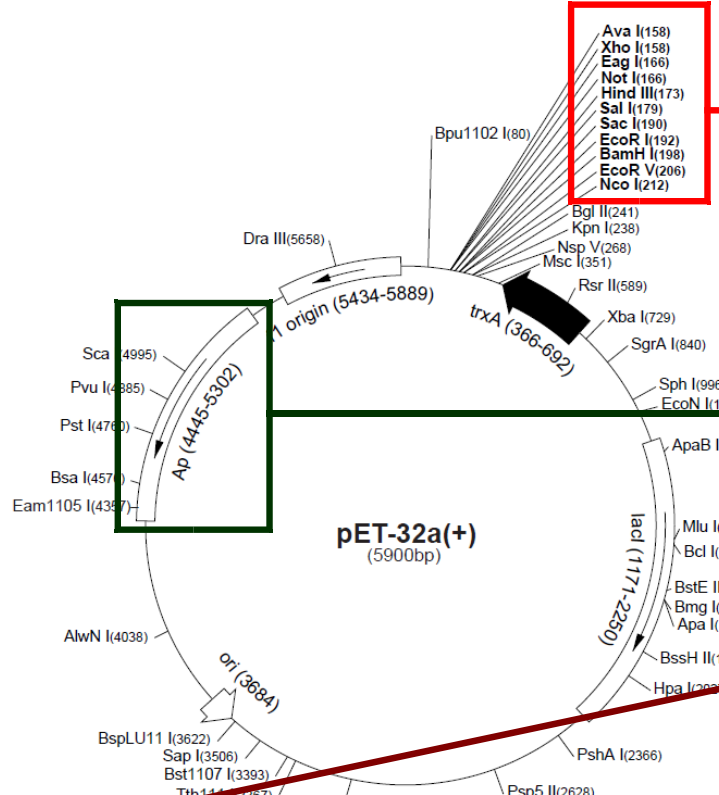


Struktura vektoru pro úinnou expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites	
(<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



- Ava I(158)
- Xho I(158)
- Eag I(166)
- Not I(166)
- Hind III(173)
- Sal I(179)
- Sac I(190)
- EcoR I(192)
- BamH I(198)
- EcoR V(206)
- Nco I(212)

Klonovací místo

Gen pro rezistenci k antibiotiku (ampicilin)

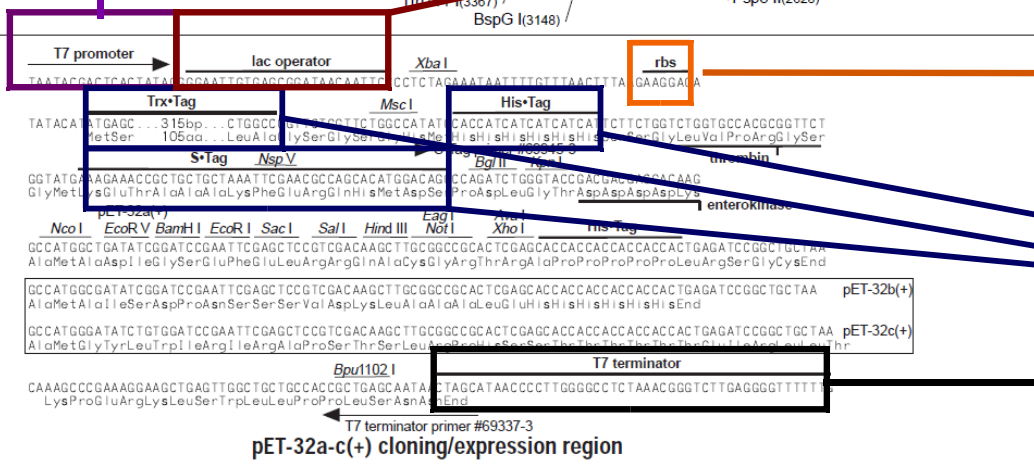
Operátor - vazebné místo pro represor

Ribozom-vazebné místo

Fúzní/purifikační značka/kotvy

Transkripční terminátor

promotor



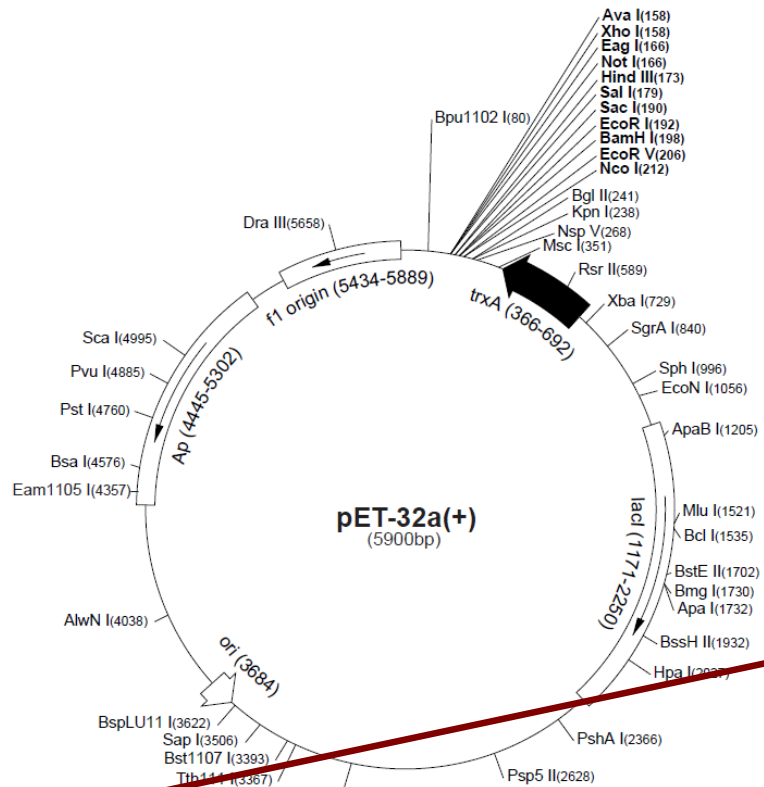
pET-32a-c(+) cloning/expression region

Struktura vektoru pro úinnou expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

pET-32a(+) sequence landmarks

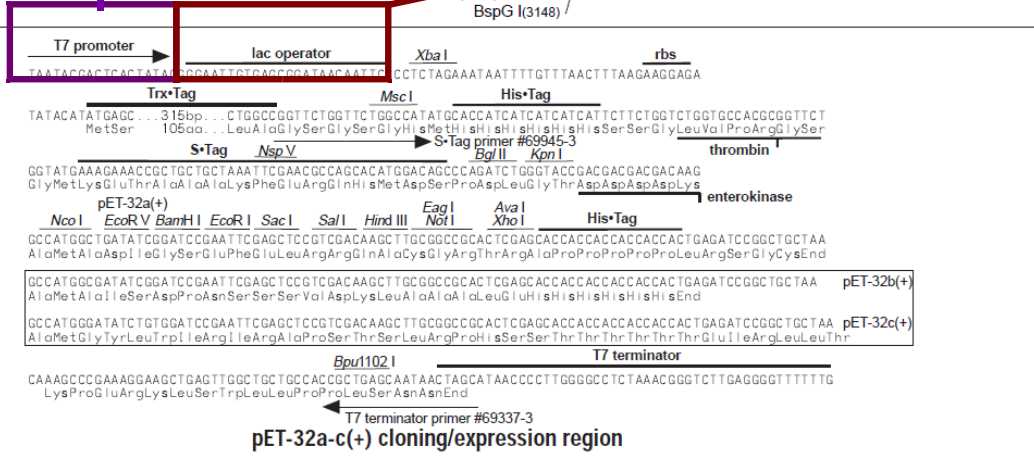
T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



promotor

**Operátor -
vazebné místo pro represor**



Vlastnosti promotoru:

ÉSilný promotor (ptac, ptrp, λ pL, pT₇)

- Protein zájmu by m 1 tvo it 10-30% a více z celkového bakteriálního proteinu.

ÉP enositelný do r zných kmen *E.coli*

ÉJednodu-e a levn inducibilní

- Teplotní indukce (λ pL)

- Chemická indukce (ptac, ptrp, pT7): IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranozid)

ÉVykazuje minimální hladinu bazální exprese

- Pokud jsou proteiny netoxické dosahuje se vysokých výt flk protein r stem bun k do vysokých hustot s následnou indukcí aktivity promotoru.

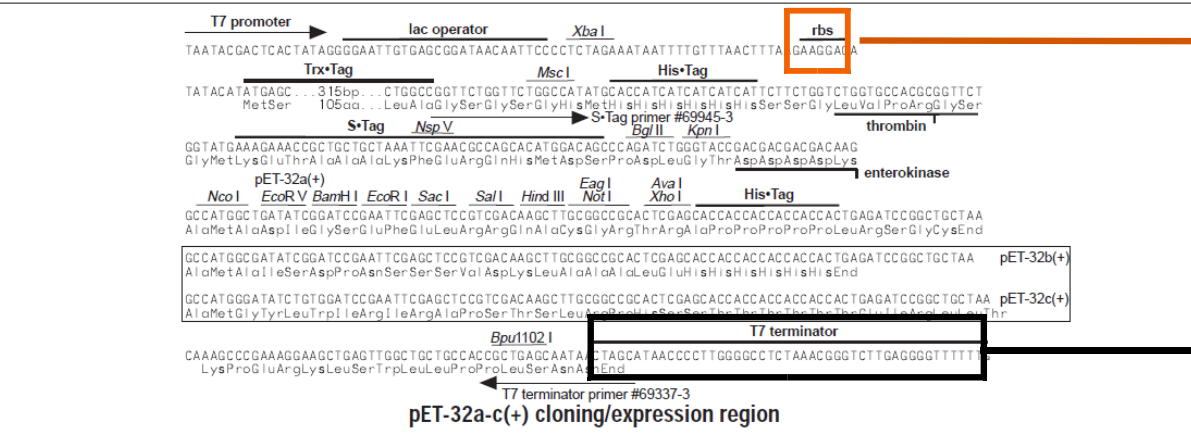
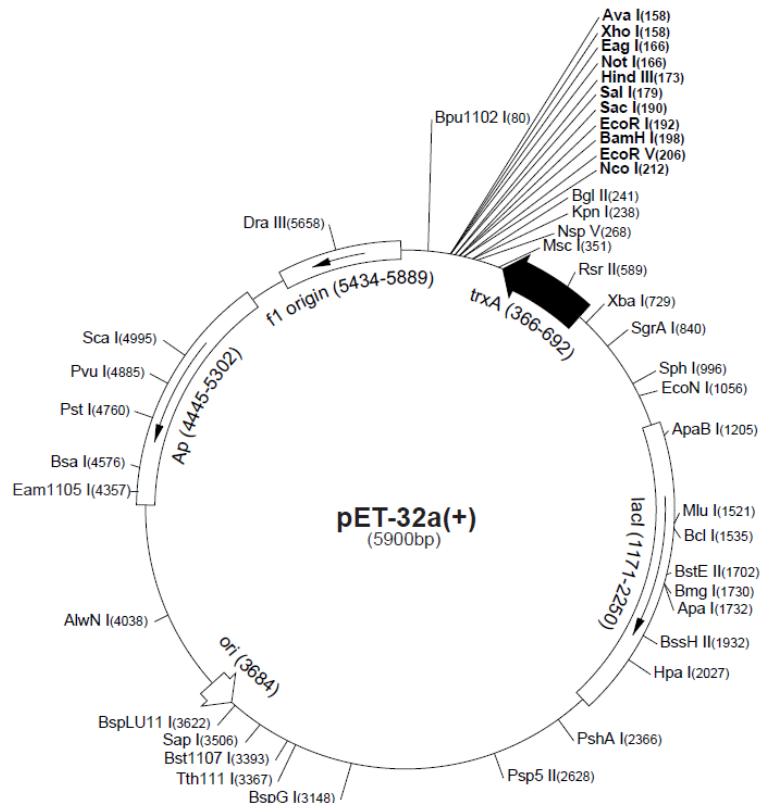
- U toxických protein pro je nutná minimalizace bazální transkripce p ed p ídavkem induk ního inidla pomocí vhodného represoru.

Struktura vektoru pro ú innou expresi rekombinantních protein v *E.coli*

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

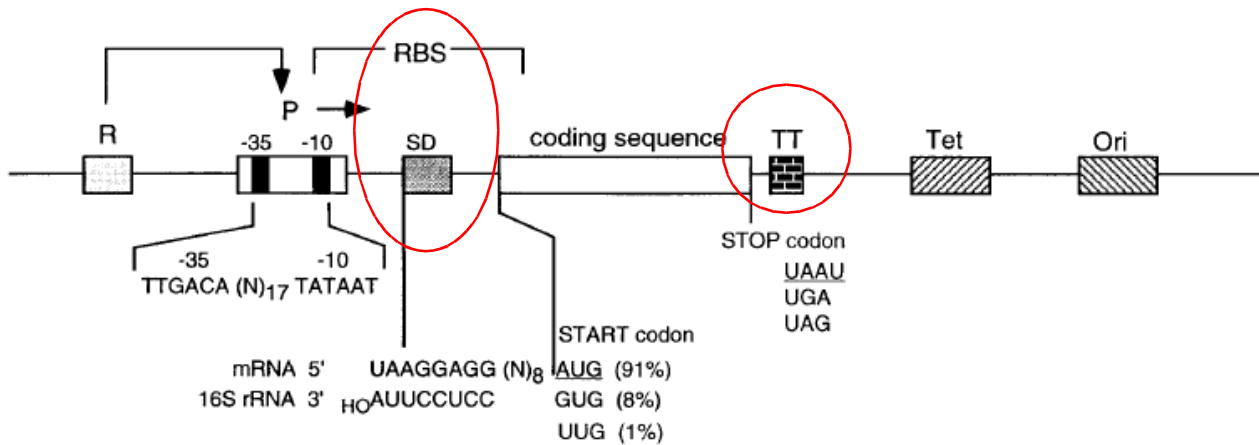
The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



Ribozom-vazebné miesto

Transkrip ní terminátor

Struktura vektoru pro účinnou expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

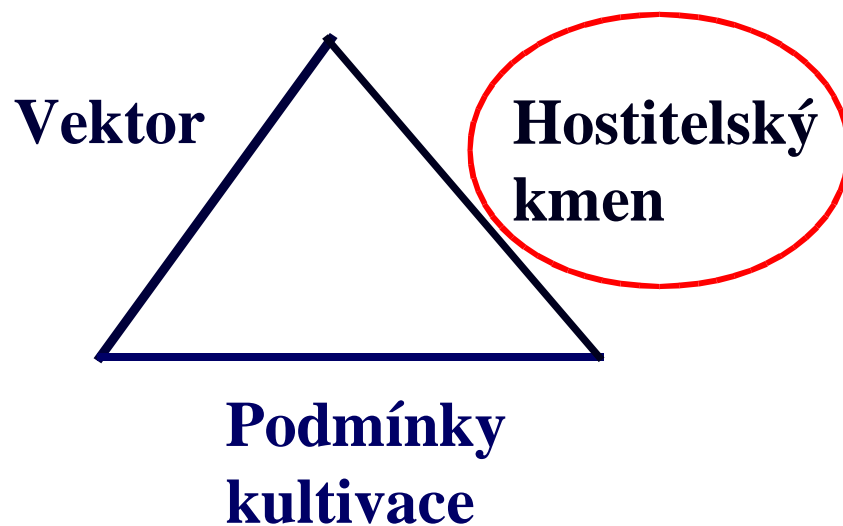


Ribozom-vazebné miesto: zahrnuje Shine-Dalgarnova (SD) sekvenci a translační iniciační kodon

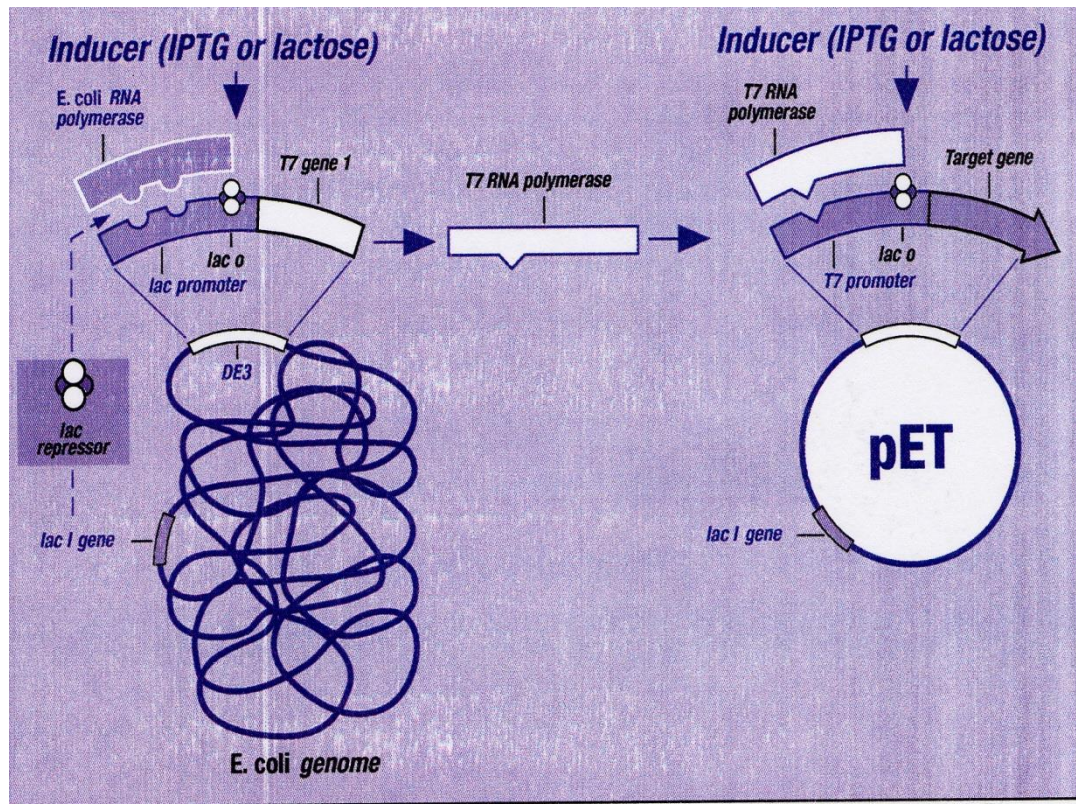
Vzdálenost mezi SD sekvencí a iniciačním kodonem AUG je 4-13 nukleotidů, tato vzdálenost ovlivňuje účinnost iniciace translace (**optimální vzdálenost je 4-8 nukleotidů**), oblast bohatá na AT páry.

Transkripční terminátor T₇ term, rrnT1,T2 (zabraňuje okluzi promotoru, zvyšuje stabilitu mRNA)

Expresní systém pro produkci rekombinantních protein v *E.coli*



Inducibilní exprese v hostitelském kmeni *E. coli* BL21(DE3)



Toxicita rekombinantního proteinu pro hostitelský kmen

ÉNení omezena na pouhý fakt, že je protein je pro buňku cizí, ale může být způsobena i tím, že je nadprodukován určitý nativní gen.

Pro hostitele jsou smrtelné:

ÉRekombinantní proteiny s hydrofóbními oblastmi mají toxický účinek - asociují s membránou nebo se inkorporují do membránového systému buňky (porušení membránového potenciálu).

ÉProteiny, které inaktivují ribozomy.

Výběr hostitelského kmene *E.coli* s ohledem na toxicitu proteinu pro hostitele



ÉNutná přísna regulace expresního systému

Komer n dostupné bakteriální kmeny s r znými úrovn mi regulace exprese, zaji– ujícími minimalizaci bazální exprese.

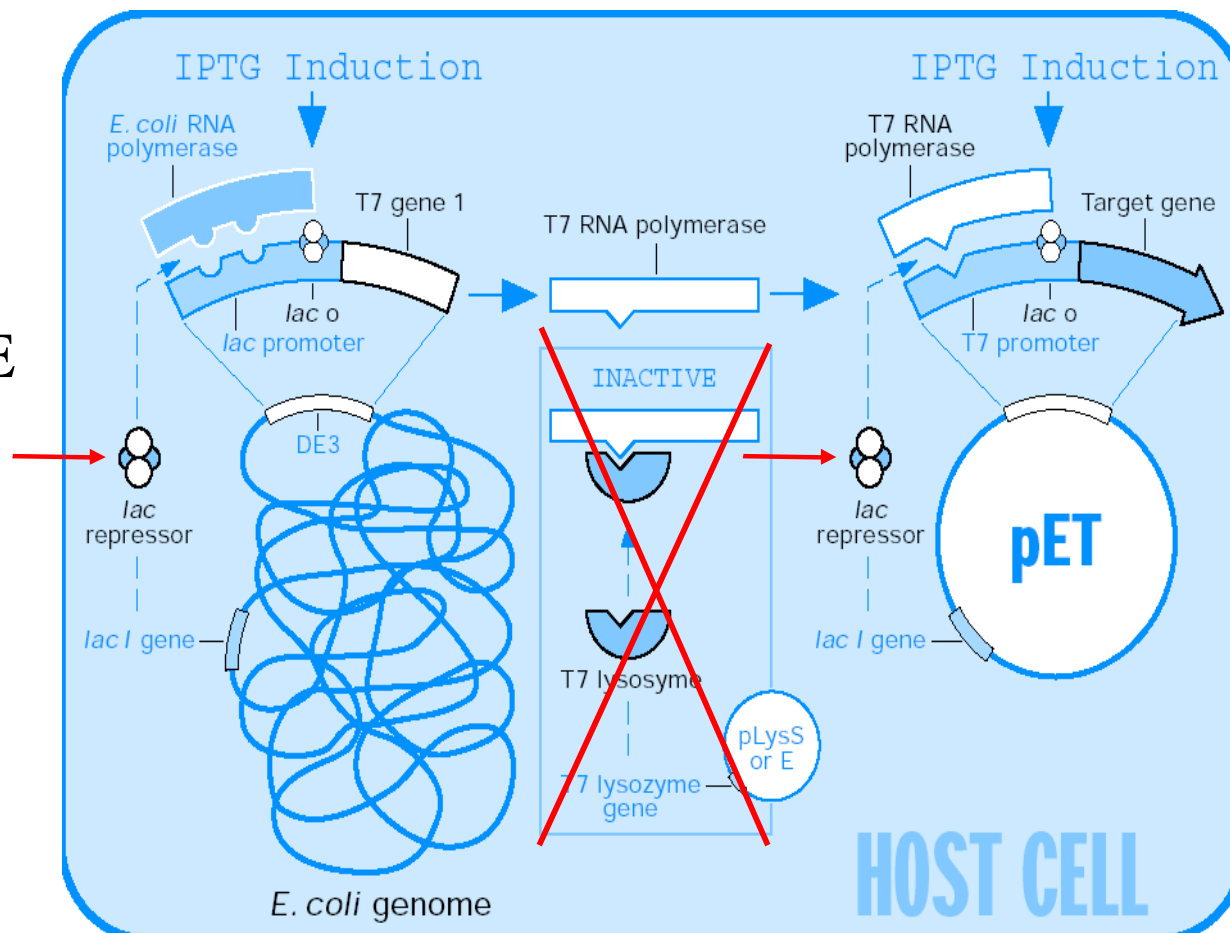
BL21(DE3)	firma Novagen
BL21(DE3)pLysS	firma Novagen

R zné úrovn minimalizace bazální exprese

✓ **BL21(DE3)**

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



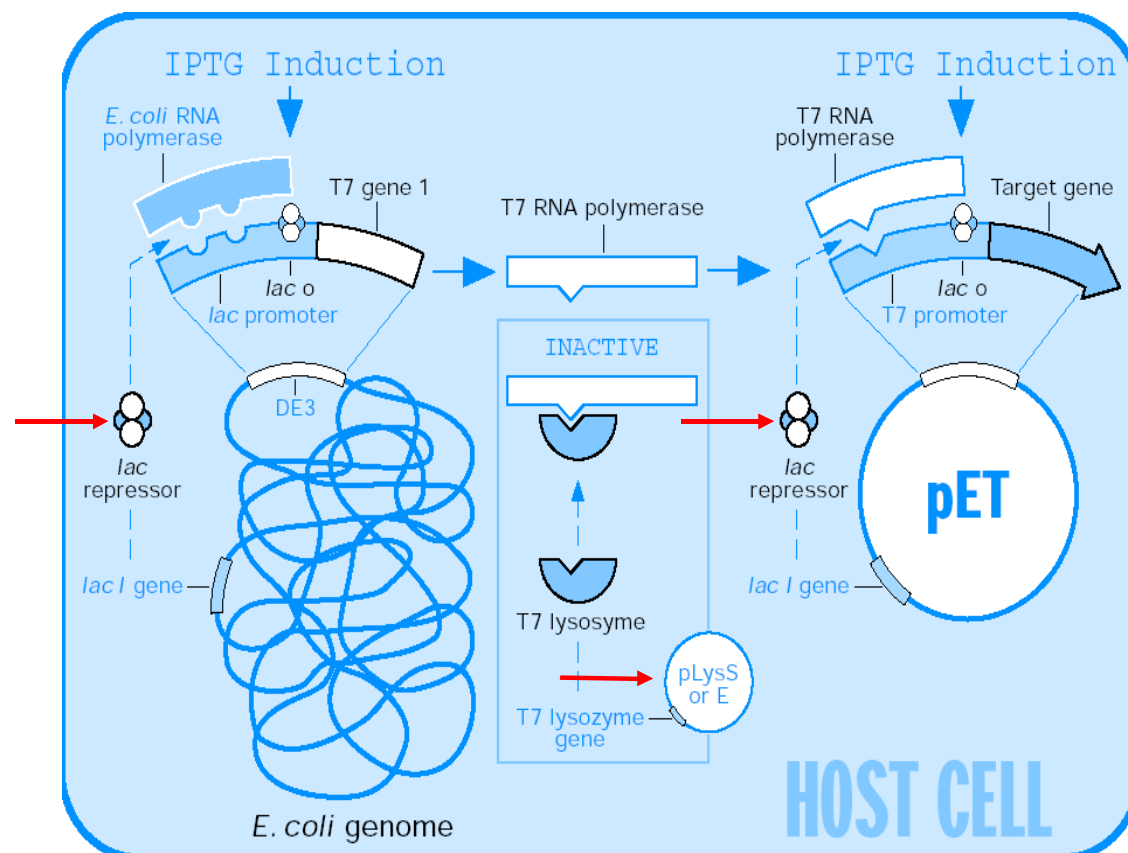
Cca 10 % hladina bazální exprese (p ed indukci exprese) klonovaného genu.

Různé úrovně minimalizace bazální exprese

BL21(DE3)

✓ **BL21(DE3)pLysS/E**

BL21



Expresní kmen obsahující plazmidy pLysS nebo pLysE umožní účinnou regulaci expresního systému využívající T7 promotor. Tyto plazmidy kódují lysozym, který se váže na T7 RNA polymerasu a inaktivuje ji a minimalizuje se tak bazální exprese.

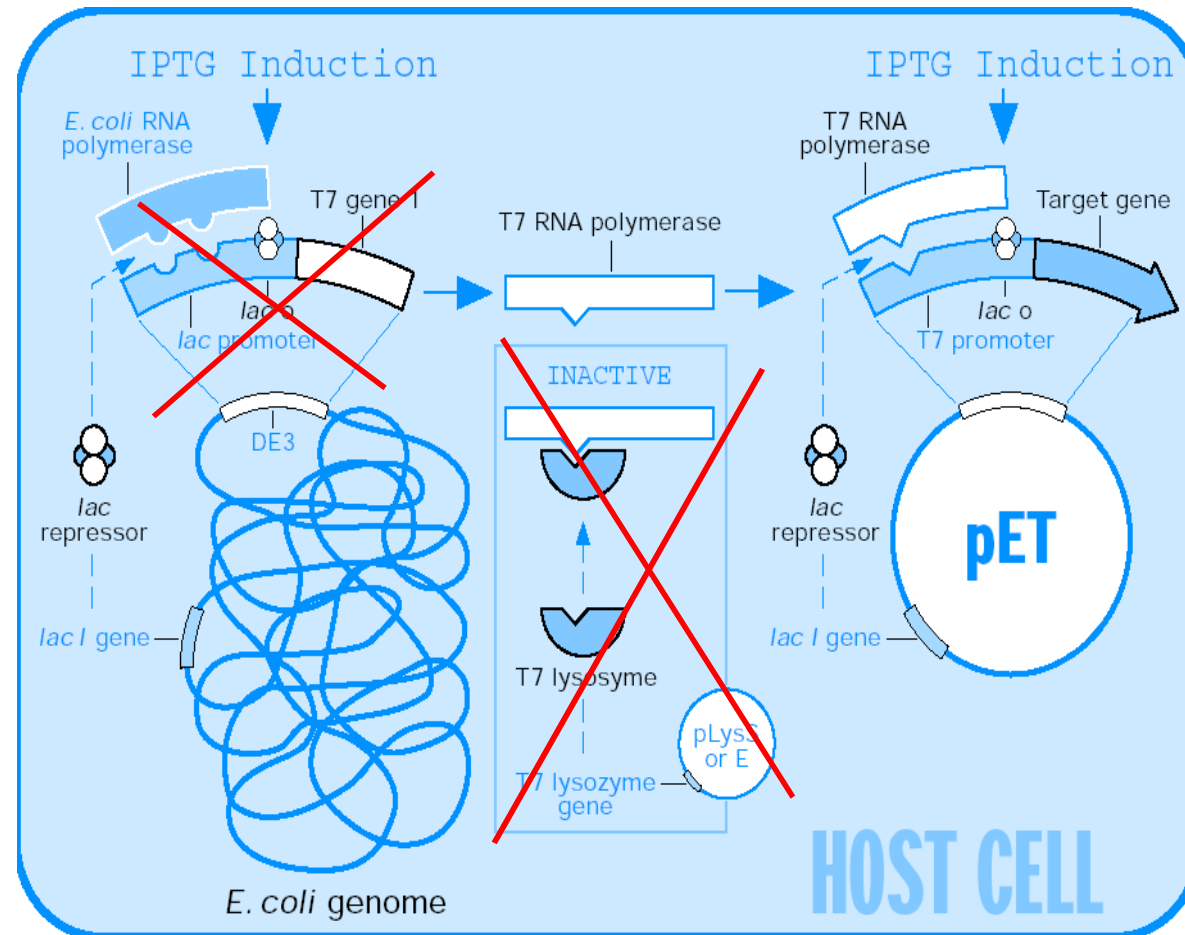
Cca 1-3% hladina bazální (před indukci exprese) exprese klonovaného genu.

Různé úrovně minimalizace bazální exprese

BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

✓ **BL21**



Indukce exprese infekcí bakteriofágem CEG (gen pro T7 RNA polymerasu)

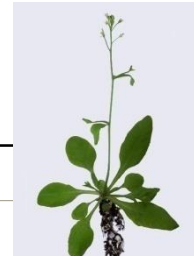
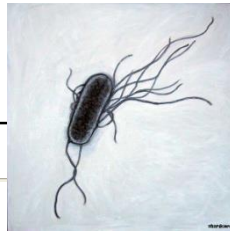
Nejvyšší úroveň exprese!!

Využívání kodon *E.coli* (codon usage)

ÉGeny u prokaryot a eukaryot se vyzna ují nenáhodným využíváním synonymních kodon .

ÉKodony z ídka využívané u *E. Coli* se mohou hojn vyskytovat u heterologních gen pocházejících z eukaryot, archebakterií aj.

ÉFrekvence využití synonymních kodon obvykle odráží zastoupení jejich tRNA v cytoplazm .



Escherichia coli K12 [gb|ct]: 14 CDS's (5122 codons)

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

UUU 19.7(101)	UCU 5.7(29)	UAU 16.8(86)	UGU 5.9(30)
UUC 15.0(77)	UCC 5.5(28)	UAC 14.6(75)	UGC 8.0(41)
UUA 15.2(78)	UCA 7.8(40)	UAA 1.8(9)	UGA 1.0(5)
UUG 11.9(61)	UCG 8.0(41)	UAG 0.0(0)	UGG 10.7(55)
CUU 11.9(61)	CCU 8.4(43)	CAU 15.8(81)	CGU 21.1(108)
CUC 10.5(54)	CCC 6.4(33)	CAC 13.1(67)	CGC 26.0(133)
CUA 5.3(27)	CCA 6.6(34)	CAA 12.1(62)	CGA 4.3(22)
CUG 46.9(240)	CCG 26.7(137)	CAG 27.7(142)	CGG 4.1(21)
AUU 30.5(156)	ACU 8.0(41)	AAU 21.9(112)	AGU 7.2(37)
AUC 18.2(93)	ACC 22.8(117)	AAC 24.4(125)	AGC 16.6(85)
AUA 3.7(19)	ACA 6.4(33)	AAA 33.2(170)	AGA 1.4(7)
AUG 24.8(127)	ACG 11.5(59)	AAG 12.1(62)	AGG 1.6(8)
GUU 16.8(86)	GCU 10.7(55)	GAU 37.9(194)	GGU 21.3(109)
GUC 11.7(60)	GCC 31.6(162)	GAC 20.5(105)	GGC 33.4(171)
GUA 11.5(59)	GCA 21.1(108)	GAA 43.7(224)	GGA 9.2(47)
GUG 26.4(135)	GCG 38.5(197)	GAG 18.4(94)	GGG 8.6(44)

Coding GC 52.35% 1st letter GC 60.82% 2nd letter GC 40.61% 3rd letter GC 55.62%

Arabidopsis thaliana [gb|pln]: 80395 CDS's (31098475 codons)

fields: [triplet] [frequency: per thousand] ([number])

UUU 21.8(678320)	UCU 25.2(782818)	UAU 14.6(455089)	UGU 10.5(327640)
UUC 20.7(642407)	UCC 11.2(348173)	UAC 13.7(427132)	UGC 7.2(222769)
UUA 12.7(394867)	UCA 18.3(568570)	UAA 0.9(29405)	UGA 1.2(36260)
UUG 20.9(649150)	UCG 9.3(290158)	UAG 0.5(16417)	UGG 12.5(388049)
CUU 24.1(750114)	CCU 18.7(580962)	CAU 13.8(428694)	CGU 9.0(280392)
CUC 16.1(500524)	CCC 5.3(165252)	CAC 8.7(271155)	CGC 3.8(117543)
CUA 9.9(307000)	CCA 16.1(502101)	CAA 19.4(604800)	CGA 6.3(195736)
CUG 9.8(305822)	CCG 8.6(268115)	CAG 15.2(473809)	CGG 4.9(151572)
AUU 21.5(668227)	ACU 17.5(544807)	AAU 22.3(693344)	AGU 14.0(435738)
AUC 18.5(576287)	ACC 10.3(321640)	AAC 20.9(650826)	AGC 11.3(352568)
AUA 12.6(391867)	ACA 15.7(487161)	AAA 30.8(957374)	AGA 19.0(589788)
AUG 24.5(762852)	ACG 7.7(240652)	AAG 32.7(1016176)	AGG 11.0(340922)
GUU 27.2(847061)	GCU 28.3(880808)	GAU 36.6(1139637)	GGU 22.2(689891)
GUC 12.8(397008)	GCC 10.3(321500)	GAC 17.2(535668)	GGC 9.2(284681)
GUA 9.9(308605)	GCA 17.5(543180)	GAA 34.3(1068012)	GGA 24.2(751489)
GUG 17.4(539873)	GCG 9.0(280804)	GAG 32.2(1002594)	GGG 10.2(316620)

Coding GC 44.59% 1st letter GC 50.84% 2nd letter GC 40.54% 3rd letter GC 42.38%

<http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Málo preferované kodony u *E.coli*

Codon(s)	Amino acid
AGA, AGG, CGA, CGG.....	Arg
UGU, UGC.....	Cys
GGA, GGG.....	Gly
AUA.....	Ile
CUA, CUC.....	Leu
CCC, CCU, CCA.....	Pro
UCA, AGU, UCG, UCC	Ser
ACA	Thr

Makrides, 1996

Expres heterologní gen obsahující málo preferované kodony vede k translačním chybám !

ÉP ed asné ukončení translace (zkrácený produkt)

ÉPosunutí čtecího rámce (posun o 2 AK v místě kodonu AGA)

ÉZáměna aminokyseliny - místo arginin (kodon AGA) za lyzin

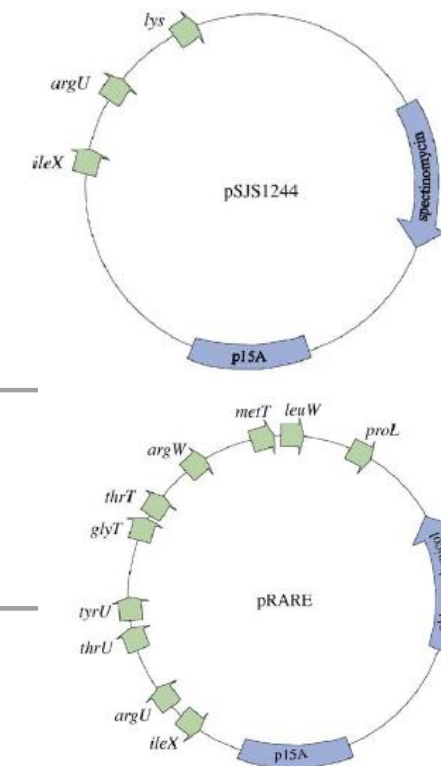
Výběr hostitelského kmene *E.coli*



Pro produkci genů obsahující velké množství kodonů, které jsou málo využívané *E.coli*, je možné použít komerčně dodávané kmeny, které produkují tRNA málo užívaných kodonů.

BL21 (DE3) CodonPlus-RIL	AGG/AGA (arginine, R), AUA (isoleucine, I) and CUA (leucine, L)	firma Stratagene
BL21 (DE3) CodonPlus-RP	AGG/AGA (arginine, R) and CCC (proline, P)	firma Stratagene
Rosetta or Rosetta (DE3)	AGG/AGA (arginine, R), CGG (arginine, R), AUA (isoleucine, I) CUA (leucine, L) CCC (proline), and GGA (glycine, G)	firma Novagen

Plasmidy komplementující tRNA.



NEBO: Místní řízená mutageneze - zaměřena na málo využívaného kodonu.

Optimalizace kodon ó syntéza gen

Optimální složení kodon pro produkci v jednom i více organismech s ohledem na vznik sekundárních struktur a stabilitu mRNA.

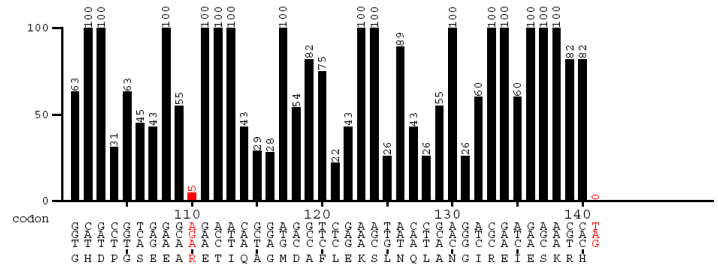
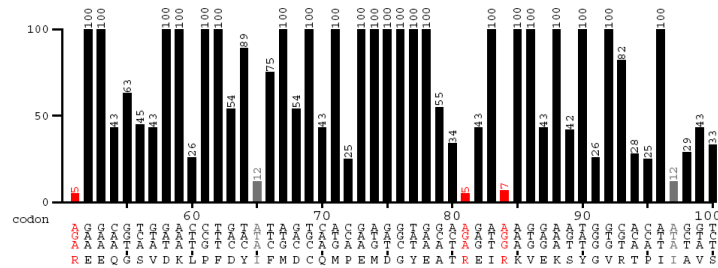
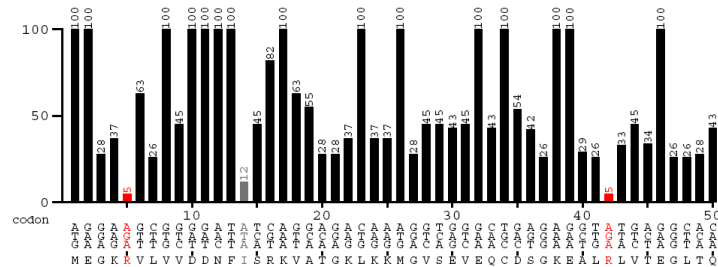


www.gcuu.de
created: 18.08.2011

CKIrd
sequence derived from Arabidopsis_thaliana

Codontable:
Escherichia_coli_K12

Ordinate (y-axis): relative adaptiveness <20% <10%

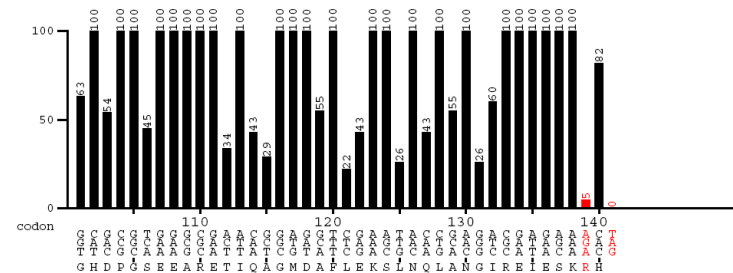
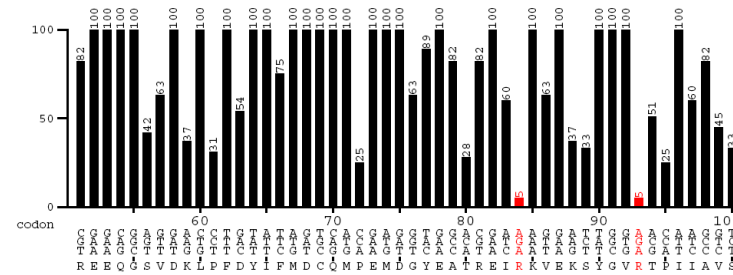
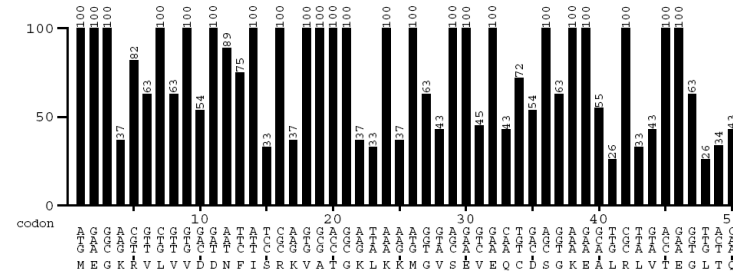


www.gcuu.de
created: 24.08.2011

CKIrd optim codon us
sequence derived from Arabidopsis_thaliana

Codontable:
Escherichia_coli_K12

Ordinate (y-axis): relative adaptiveness <20% <10%



Degradace proteinu

Bakteriální proteolytický systém:

- *E. coli* obsahuje velké množství proteas, nejvíce v cytoplazm

- Selektivn odstra uje šabnormálníõ proteiny:

ÉNekompletní polypeptidy

ÉProteiny se zam n nými AK

ÉNadm rn syntetizované podjednotky multimerních protein

ÉProteiny po-kozené oxidací nebo volnými radikály

ÉCizí, rekombinantní proteiny (problémem jsou proteiny < 10 kDa)

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



Kmeny deficientní na proteasy

ÉMutace, eliminující produkci proteas a tím proteolytickou degradaci rekombinantních protein .

Expresní kmeny **BL21** jsou deficientní na:

cytoplazmatickou proteasu *lon*
periplazmatickou proteasu *ompT*

Aminokyseliny redukující stabilitu heterologního proteinu

1. N-koncové pravidlo

É Stabilita proteinu je ovlivněna aminokyselinou, která následuje první aminokyselinu polypeptidového řetězce (methionin).

É Aminokyseliny na této pozici redukují stabilitu proteinu:

Arg, Lys, Leu, Phe, Tyr a Trp

É Poločas rozpadu proteinu pouze 2 min

2. Lysin ve vnitřní sekvenci poblíž N-konce proteinu

É Degradace ubiquitin-dependentními proteasami

3. PEST hypotéza

É Oblasti bohaté na Pro (P), Glu (E), Ser (S), Thr (T)

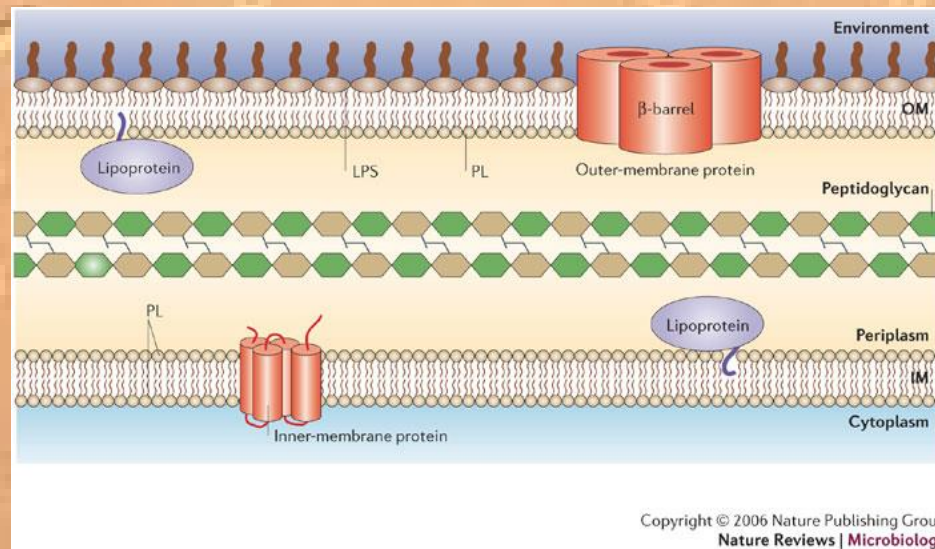
É Po fosforylaci PEST degradace proteinu Ca-dependentními proteasami

Cílená exprese proteinu

Cytoplazmatická exprese

Periplazmatická exprese

Extracelulární exprese
(do kultiva ního média)



Cytoplazmatická exprese

ÉPreferovaný způsob

Výhody

ÉVysoký výtěžek proteinu

ÉJednodušší plazmidové konstrukty

ÉInkluzní tělíska

Nevýhody

ÉInkluzní tělíska

ÉRedukční prostředí

ÉProteolýza

ÉVíce komplexní purifikace

Inkluzní tělíska

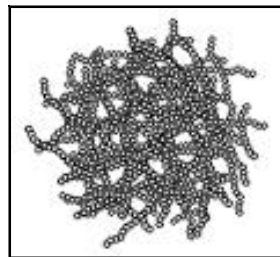
Nerozpustné shluky (cca $2\mu\text{m}^3$) složené z nativních proteinů s nízkou rozpustností, z nesložených nebo z částečně poskládaných proteinů

Co způsobuje jejich tvorbu?

1. Prostředí v *E. coli* se liší od přirozeného prostředí ve smyslu redoxního potenciálu (redukce prostředí v cytoplazmě *E. coli*), pH, osmolarita, absence chaperonů, kofaktorů, absence post-translačních modifikací

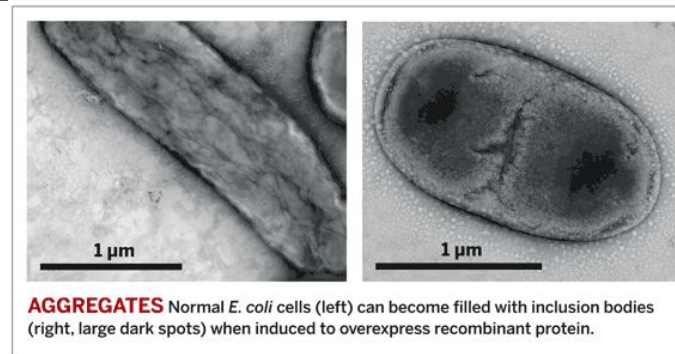
2. Vysoká hladina exprimovaných proteinů

- exponované hydrofóbní domény nesbalených polypeptidových řetězců navzájem (intramolekulárně) asociují



Rozpustný protein

Inkluzní tělíska z nerozpustného proteinu



Inkluzní t líska

Výhody

ÉSnadná izolace ve vysoké čistotě a koncentraci

ÉOchrana před proteasami

ÉPro produkci proteinů, jejich aktivita je pro buňku letální

Nevýhody

ÉProteinová nerozpustnost

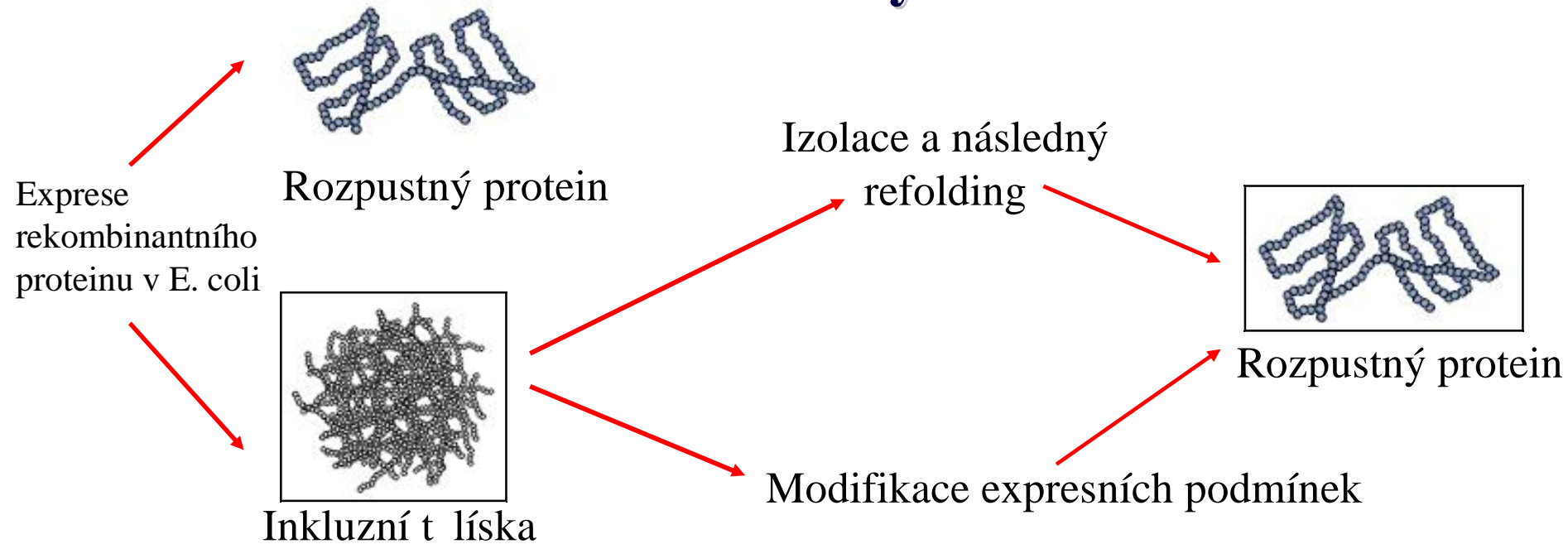
ÉRefolding pro optimální získání biologické aktivity

ÉRefolding nemusí vést k zaktivování proteinu

ÉRedukce výtěžku proteinu

ÉZvyšují se náklady

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělíček



É Snížení teploty kultivace bakteriální kultury

É Koprodukce chaperon

É Použití fúzního partnera zlepšujícího solubilizaci (thioredoxin)

É Selekcce rezistentních kmenů E.coli kmenů - například bakteriální kmene deficientní na thioredoxin reduktasu

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělíček

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



É Pokud protein obsahuje jeden nebo více disulfidických vazeb, správné poskládání proteinu je stimulováno v hostiteli s více oxidujícím prostředím cytoplazmy.

É AD494	É Mutace v genu pro thioredoxinreduktasu (trxB)	É Novagen
É Origami	É Dvojitá mutace v genu pro thioredoxinreduktasu (trxB) a glutathionreduktasu (gor)	É Novagen

Periplazmatická exprese

É Periplazma obsahuje jen 4% všech buněčných proteinů (cca 100 proteinů)

É Transmembránový transport je zprostředkován signálním peptidem na N-konci proteinu

É Prokaryotické signální peptidy úspěšně použité v *E.coli* (ompA, ompT z *E.coli*, protein A z *S. Aureus*, endoglukanasa z *B.subtilis*)

Výhody

É Jednodušší purifikace

É Není zde tak rozsáhlá proteolýza

É Zlepšení tvorby disulfidických můstků /foldingu

Nevýhody

É Signální peptid nezajistí vždy transport do periplazmy

É Mohou se také tvořit inkluzní tělíska

Extracelulární exprese

É Sekrece proteinů do kultivačního média

É Chybí účinná cesta pro transport skrz vnější membránu (*E.coli* sekretuje velmi málo proteinů).

É Některé proteiny sekretované do periplazmy pasivně difundují do média.

É Zatím spíše neúspěšná manipulace s různými transportními cestami, které by usnadňovaly sekreci cizího proteinu.

Výhody

É Minimální kontaminace ostatními proteiny (jednodušší purifikace)

É Nejmenší hladina proteolýzy

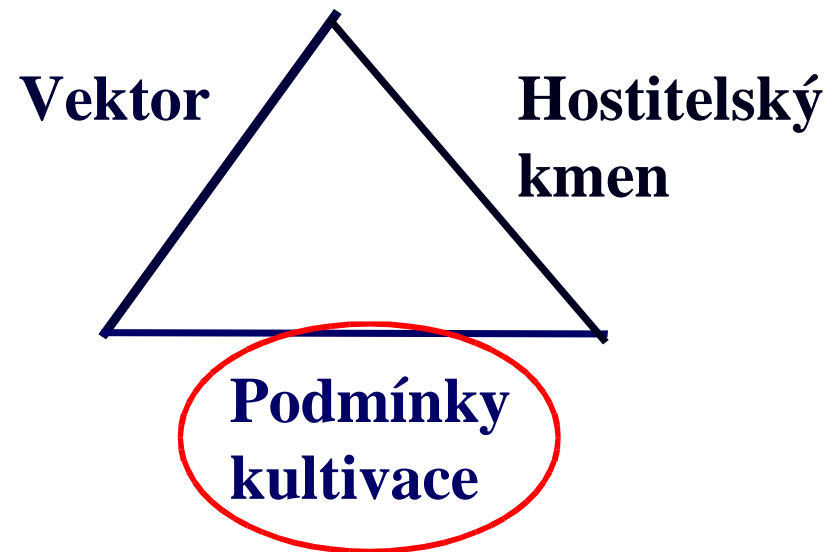
É Zlepšení foldingu

Nevýhody

É Často nízká sekrece

É Hodně ztracený protein

Modifikace r stových podmínek



Podmínky kultivace

Možnosti zvýšení produkce rozpustného proteinu

Experimentálně se optimalizuje:

É Hustota buněčné kultury

É Složení média (pH, přísádky specifických substrátů, kofaktory, složení živin-bohaté i minimální média)

É Teplota růstu bakterií a teplota po indukci exprese

É Koncentrace indukčního induktoru

É Délka indukce exprese

Vliv složení média na produkci rostlinné β -glukosidasy v *E. coli*

Vliv různých podmínek exprese na aktivitu mutantní formy kukuřičné β -glukosidasy F461L.

ÉpH LB média

ÉP ítomnost substrátu
(celobiosa na indukci
exprese)

<i>podmínky</i>	<i>Specifická aktivita (nkat/mg)</i>
LB médium pH 6	2,0
LB médium pH 7	4,2
LB médium pH 8	2,8
Specifická aktivita byla po expresi za uvedených podmínek měřena v nativních lyzátech použitím 1% celobiosa (na indukci exprese)	2,7

Vliv teploty kultivace na produkci rostlinných AHP proteinů v *E. coli*

Podmínky:

1. Médium: LB médium, bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS

R *st* (*OD*₆₀₀~0.5-0.6) *Indukce* 0,4 mM IPTG/3hodiny

22°C 22°C (3)

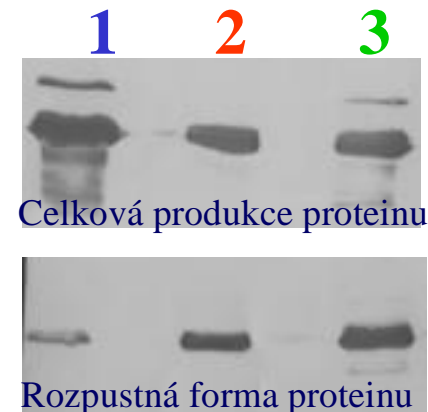
37°C 22°C (2)

37°C 28°C (1)

Test rozpustnosti:

2. Příprava proteinových lyzátů za silně denaturujících podmínek (celková produkce proteinu = rozpustná + nerozpustná forma) a za nativních podmínek (rozpustná forma proteinu).

3. SDS PAGE denurujících a nativních proteinových lyzátů s následnou analýzou western blottingem.

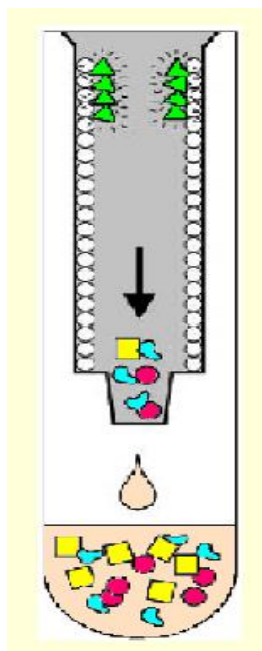


4. Detekce proteinu pomocí série protilátek a kvantifikace signálů pomocí programu pro analýzu 1-D gelů (př. Quantity One- BioRad, Quanti Scan-přístupný na internetu).

Vliv teploty kultivace na produkci rostlinných AHP proteinů v *E. coli*

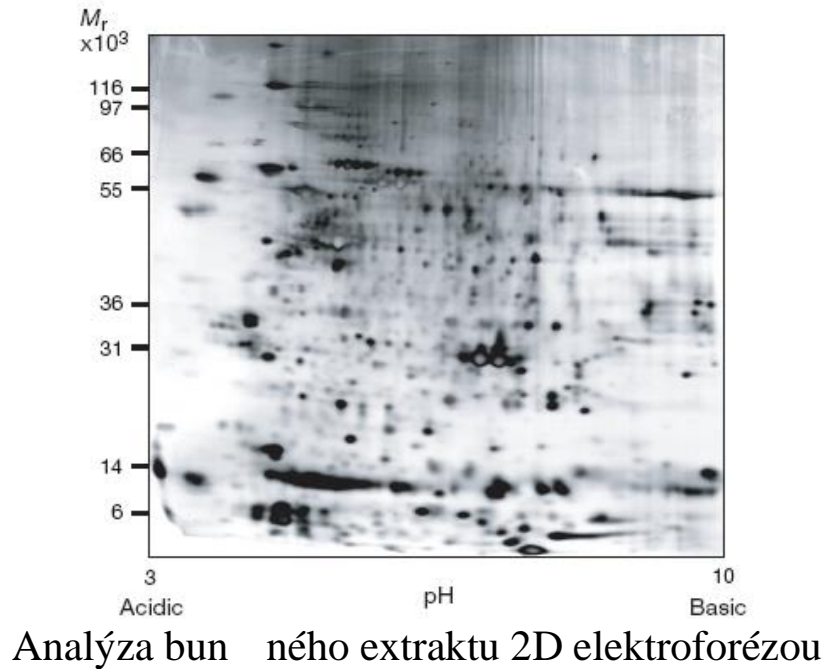
Procenta produkce AHP proteinů v rozpustné formě						
<i>t</i> (°C) <i>R st/indukce</i>	AHP1	AHP2	AHP3	AHP4	AHP5	AHP6
37°C/28°C	8 %	85 %	100%	0	76 %	0
37°C/22°C	82 %	73 %	100%	0	81 %	51 %
22°C/22°C	71 %	78 %	100%	30 %	81 %	73 %

2. část: Purifikace rekombinantních protein



Purifikace protein fúzovaných s GFP
pomocí hydrofóbní matrice

Purifikace proteinu z komplexní směsi makromolekul přítomných v biologickém vzorku (buněčný nebo tkáňový extrakt)



ÉN kolik tisíc proteinů s různými vlastnostmi (~5000-8000) a v různých množstvích (aktin ~ 10%, unikátní transkripční faktor < 0,001% z celkového proteinu)

ÉDNA, RNA, polysacharidy, lipidy

Neflza nemeí í í í í í í í í

1. Pro ???

Pro jaký účel ?

2. Jak ???

Jak protein detekovat?

3. Co ???

Jaké vlastnosti má protein ?

1. Pro ???

Pro jaký účel?

Aplikace	Množství	čistota	Poznámka
Identifikace	0,002-0,2 μg	vysoká (>95%)	Édmanovo odbourávání (5-10 pmol), přístupy hmotnostní spektroskopie (0,2-1 pmol)
Produkce protilátek	μg-mg	střední-vysoká	ÉPro imunizaci: ~ 0,1 μg proteinu É čím větší čistota tím větší a rychlejší –ance pro získání vysoce specifické imunitní odpovědi.
Enzymologie	1-5 mg	vysoká > 95 %	ÉMnožství proteinu závisí na citlivosti analýzy. É čistota závisí na specifitě analýzy a ovlivňuje výsledky analýzy kontaminacemi.
Biofyzikální studie	mg-g	vysoká (>95%)	ÉCD spektroskopie, rezonance povrchových plasmonů, fluorimetrie, analytická ultracentrifugace, UV spektroskopie
3D struktura (krystalizace, NMR)	10-20 mg	vysoká (>95%)	ÉHledání krystalizačních podmínek ~ 1-2 mg proteinu, získání krystalu o velikosti dostatečné pro rentgenovou difrakci 5-10 mg proteinu ÉPro první 1-D NMR spektra se vyžaduje ~ 0,5 μmol proteinu, protein (velikost 5-20 kDa) značený ¹⁵ N / ¹³ C je nutný pro vyřešení struktury.
Farmaceutické účely	mg-kg	vysoká (99,9%)	ÉPro klinické účely nesmí proteiny obsahovat pyrogeny a bakteriální toxiny a musí být velmi stabilní kvůli dlouhodobému skladování.

2. *Jak???*

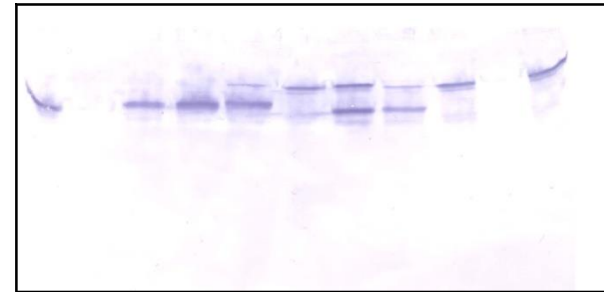
Jak budeme protein analyzovat?

1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza se specifickou detekcí :

Detekce proteinu zájmu b hem jeho purifikace (SDS PAGE)

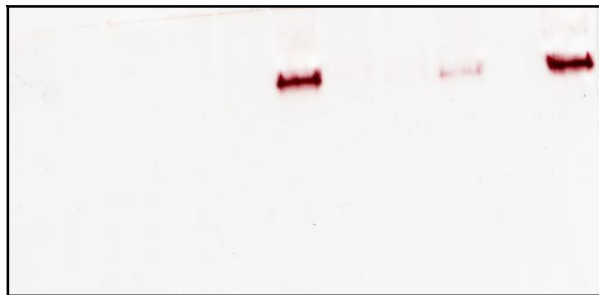
ÉPomocí protilátek

SDS PAGE s následných
westernovým p enosem



Sledování biologické aktivity proteinu b hem purifikace (NATIVNÍ PAGE)

ÉU enzym nap . barvení v gelu pomocí chromogenních substrát (nebo stanovení specifických konstant v komplexních vzorcích)



nativní PAGE, zymogram

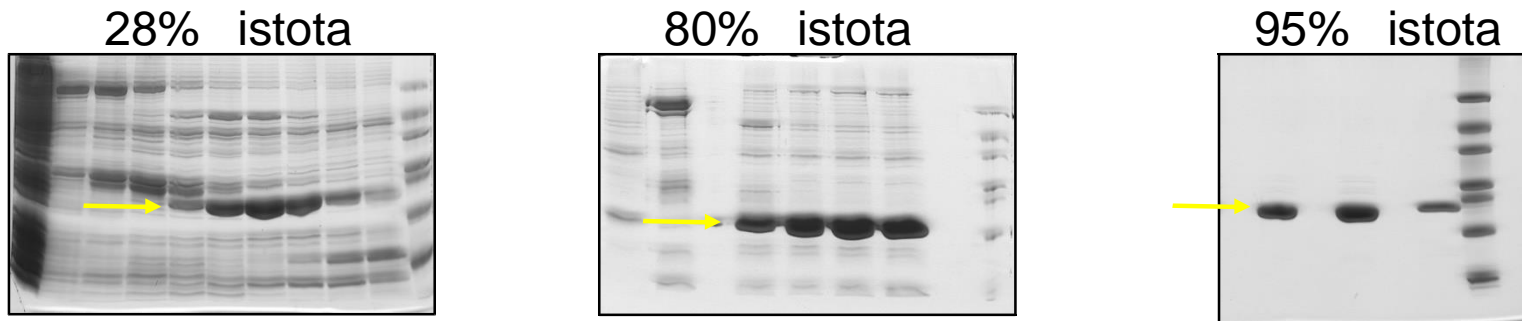
2. *Jak???*

Jak budeme protein analyzovat?

2. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek s nespecifickou detekcí

ÉBarvení pomocí Coommasie blue, st íbra,...

ÉSledování istoty purifikovaného proteinu



2. *Jak???*

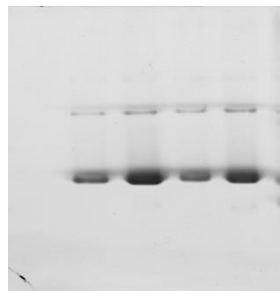
Jak budeme protein analyzovat?

3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za nativních podmínek s nespecifickou detekcí

Barvení pomocí Coommasie blue, stříbra,...

Sledování homogenity purifikovaného proteinu

Nativní PAGE



— Dimer
— Monomer

4. Stanovení koncentrace proteinu

Nejvíce využívané metody: dle Bradfordové, Lowryho metoda, ...

3. Co???

Jaké vlastnosti má protein ?

Informace o proteinu zájmu a p íbuzných proteinech z databází nebo z pilotních experiment :

ÉVelikost proteinu (SDS PAGE, gelová filtrace nebo analytická centrifugace)

ÉIzoelektrický bod (izoelektrická fokusace)

ÉStabilita (pH, teplota, p ítomnost solí, proteas, additiv zaji– ujících rozpustnost proteinu)

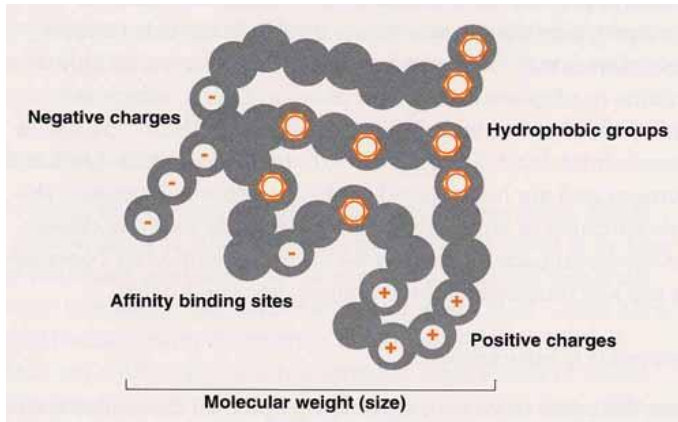
2D a nativní PAGE

ÉKomplexita vzorku, vlastnosti proteinu zájmu a i ostatních kontaminujících protein

Informace o proteinu zájmu a o p íbuzných proteinech z literatury:

ÉStrategie purifikace (metody, pufry, stabilita proteinu, í ..)

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontovým výměnnou chromatografie

Hydrofobicita

hydrofóbní chromatografie

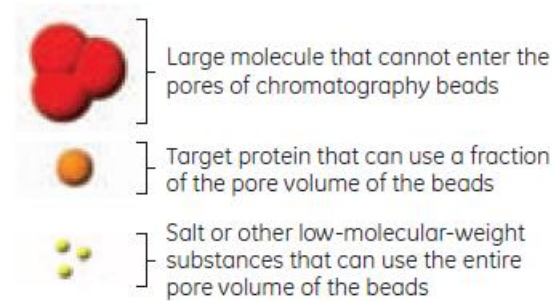
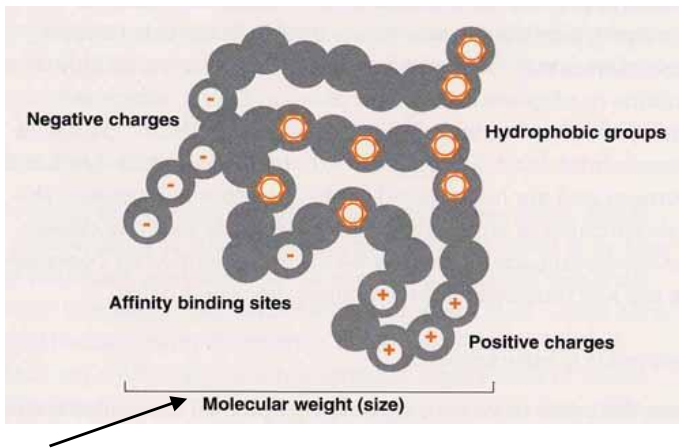
Specifická vazba

afinitní chromatografie

Posttranslační modifikace

afinitní chromatografie

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontovým nábojem chromatografie

Hydrofobicita

hydrofóbní chromatografie

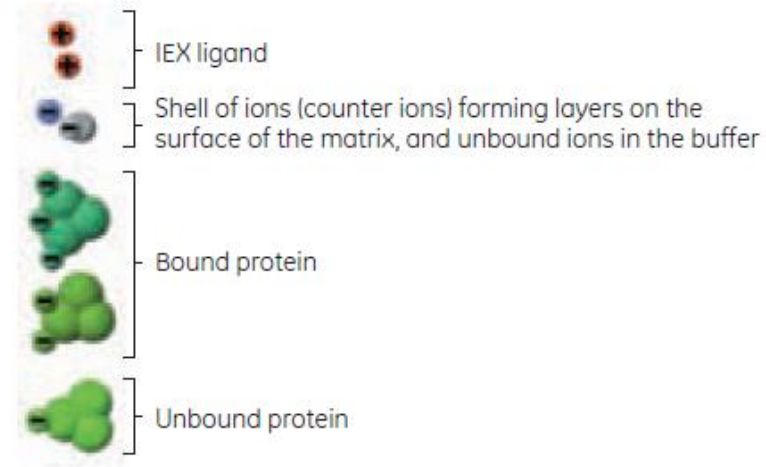
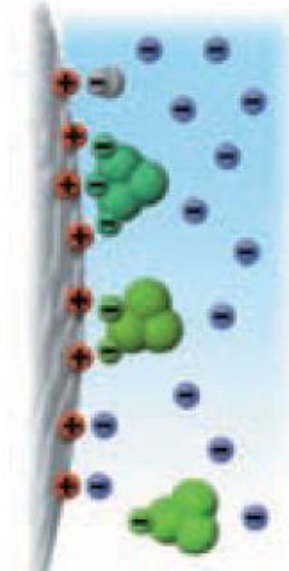
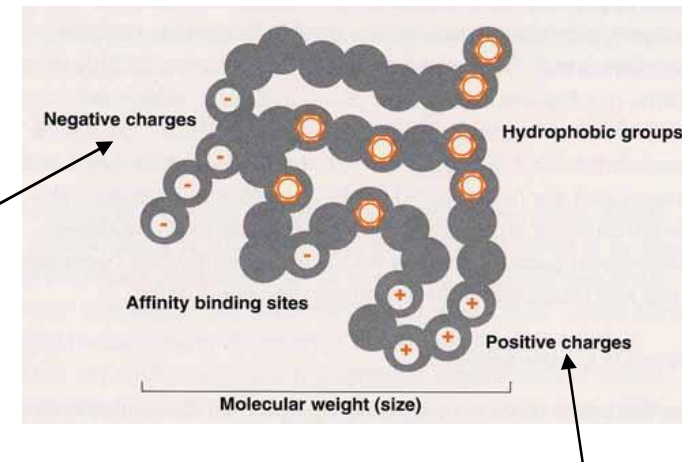
Specifická vazba

afinitní chromatografie

Posttranslační modifikace

afinitní chromatografie

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontovým nábojem iontová chromatografie

Hydrofobicita

hydrofóbní chromatografie

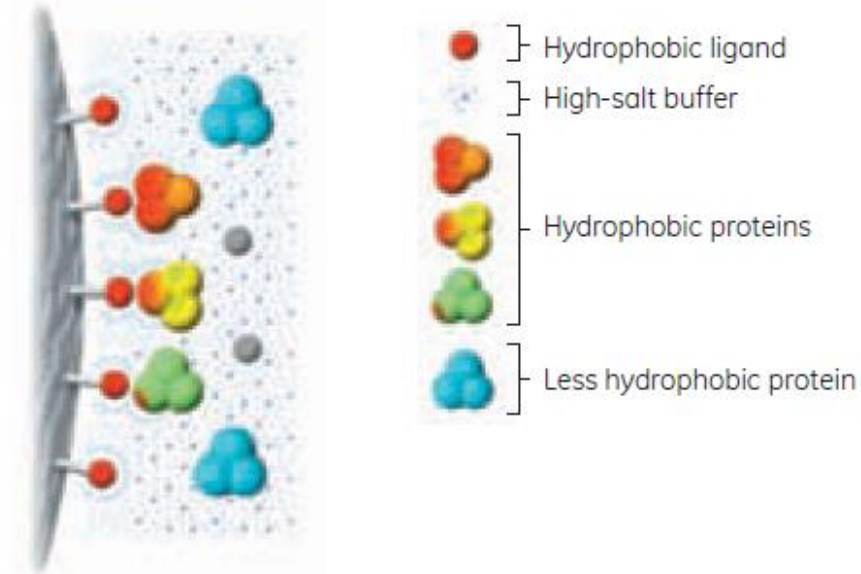
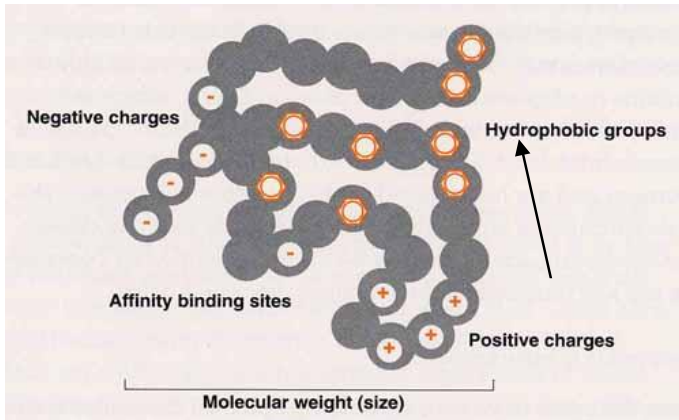
Specifická vazba

afinitní chromatografie

Posttranslační modifikace

afinitní chromatografie

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontovým výměnnou chromatografií

Hydrofobicitá

hydrofóbní chromatografie

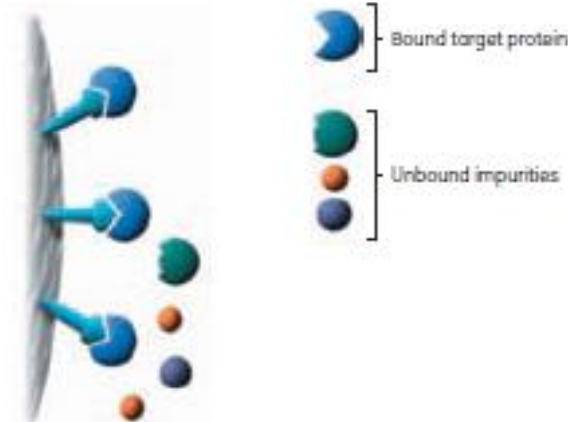
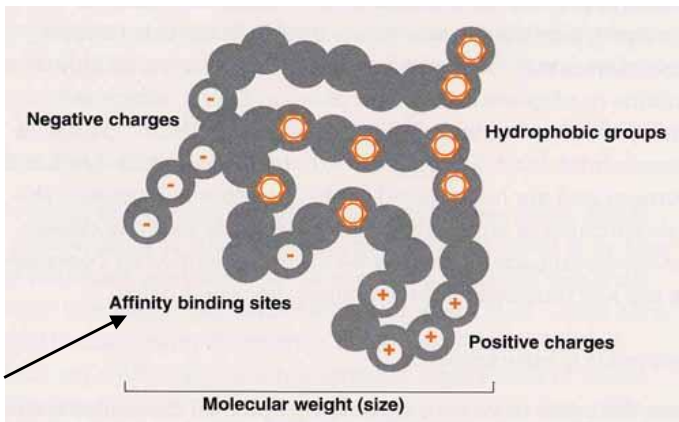
Specifická vazba

afinitní chromatografie

Posttranslační modifikace

afinitní chromatografie

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontovým výměnnou chromatografií

Hydrofobicita

hydrofóbní chromatografie

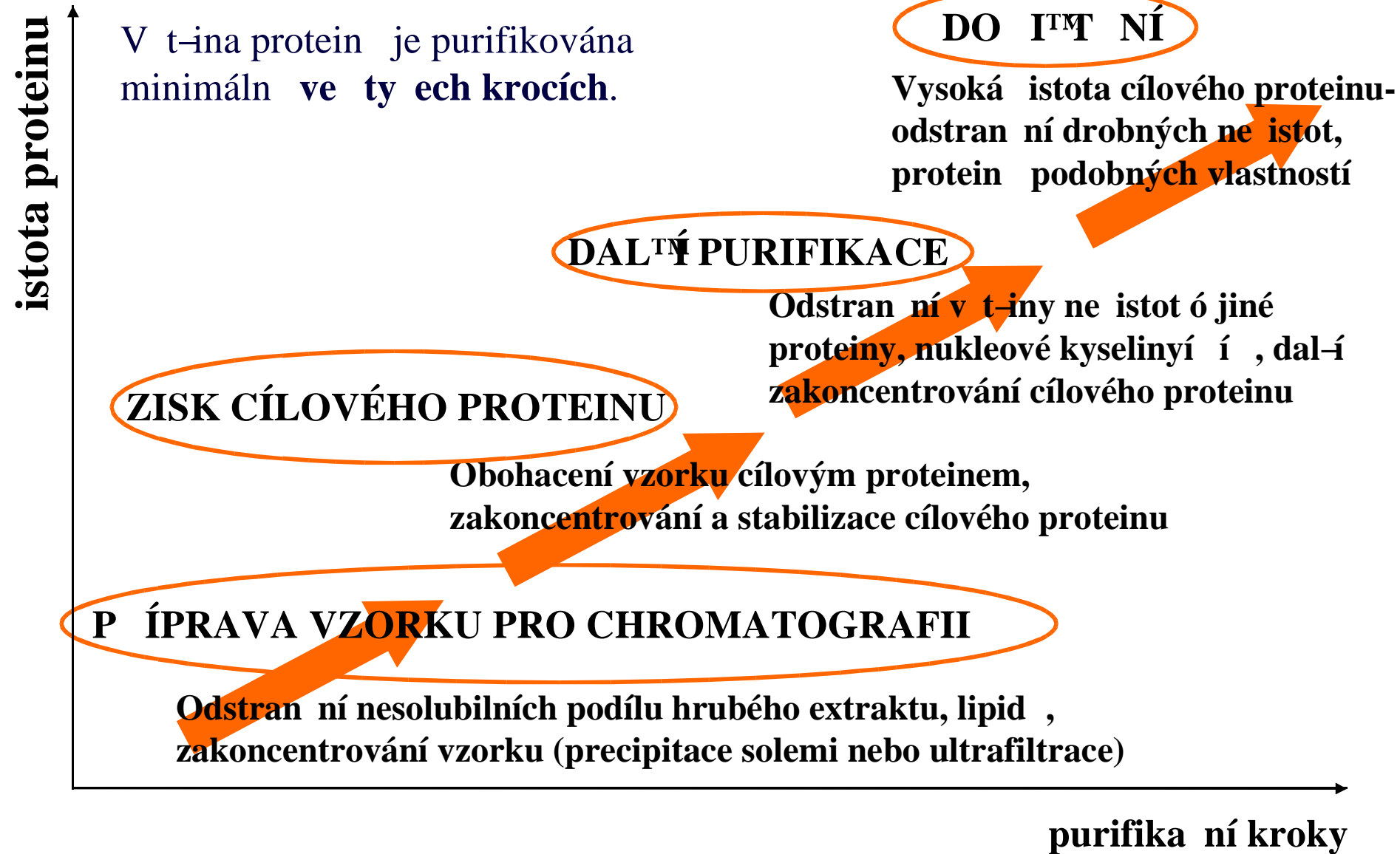
Specifická vazba

afinitní chromatografie

Posttranslační modifikace

afinitní chromatografie

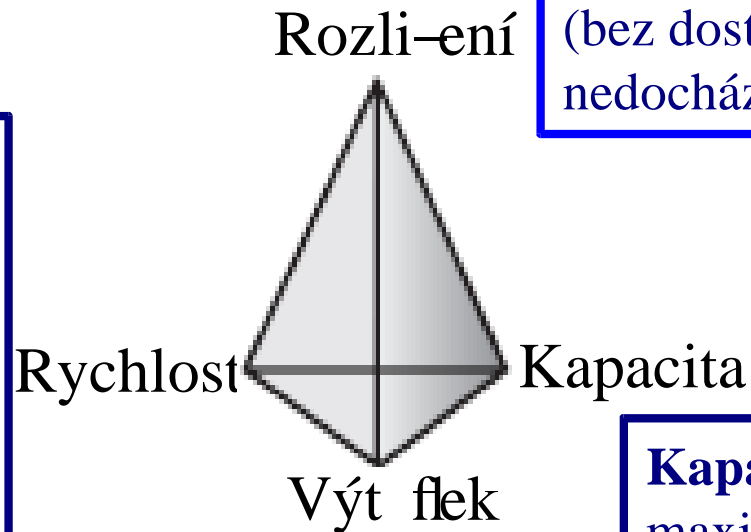
Kolik purifikačních kroků je potřeba?



Logická kombinace purifikačních kroků

Každá separační technika je vyznačena rovnováhou mezi **tymi parametry**.

Rozlišení je rozsah separace mezi dvěma chromatografickými píky (bez dostatečného rozlišení nedochází k separaci proteinů).



Rychlost kroku je důležitá zejména v kvůli možné degradaci cílového proteinu působením proteas v komplexním vzorku.

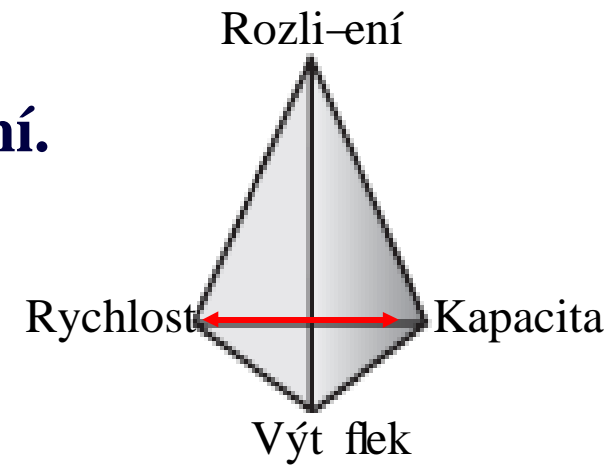
Kapacita (max.) je maximální množství vzorku, které může být navázáno na chromatografickou kolonu.

Výtěk-minimalizace ztráty proteinu během purifikace.

Získ cílového proteinu z proteinového extraktu

Cíl: rychlá izolace, stabilizace a zakoncentrování.

**Purifikační techniky: afinitní chromatografie
iontomní chromatografie
hydrofóbní chromatografie**



Column: rProtein A Sepharose Fast Flow, XK16/20, bed height 4.8 cm (9.6 ml)
Sample: 600 ml clarified cell culture containing 87.6 mg of IgG_{2a}
Starting buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0
Elution buffer: 20 mM sodium citrate, pH 4.0
Flow rate: 5 ml/min (150 cm/h)

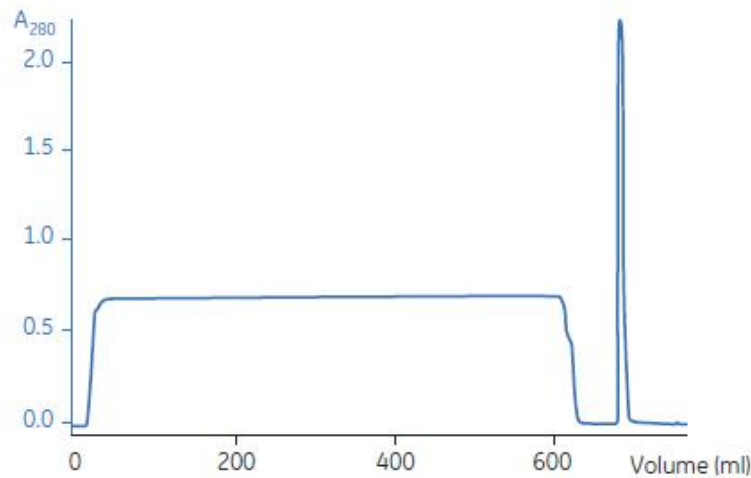
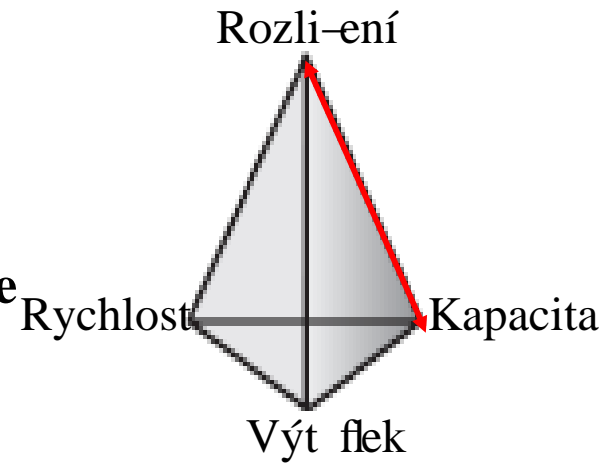


Fig 4.5. Example of capture step: Purification of IgG_{2a} from clarified cell culture.

Další purifikace proteinu

Cíl: Purifikace a zakoncentrování.

Purifikační techniky: iontomniová chromatografie
hydrofóbní chromatografie
gelová filtrace
afinitní purifikace



Column: XK 16/20 Butyl Sepharose 4 Fast Flow
Sample: 5 ml of partially purified Annexin V expressed in *E. coli*
Buffer A: 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Buffer B: 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0
Flow rate: 100 cm/h
Gradient: 0 to 50% B, 20 column volumes

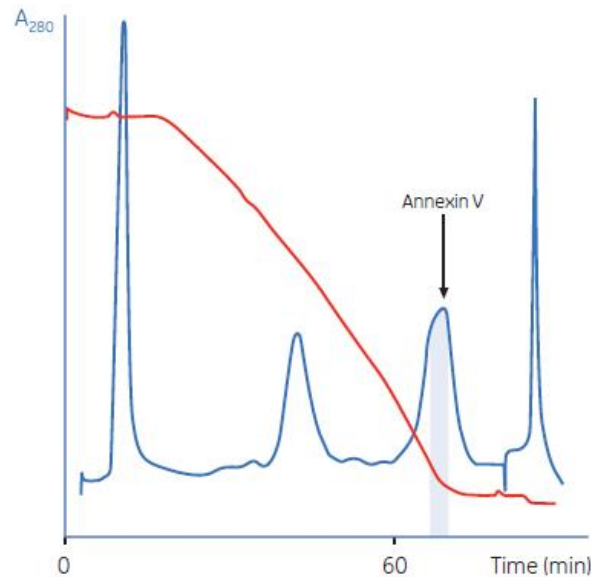
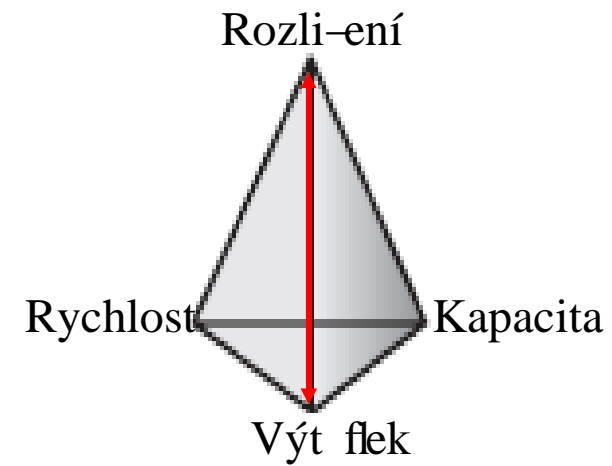


Fig 4.7. Example of an intermediate purification step: Purification of recombinant Annexin V by HIC.

Do i-t ní proteinu a úprava podmínek pro jeho skladování (pH, soli, additiva)

Cíl: Produkt o požadované vysoké čistotě .

Purifikační techniky: gelová filtrace
afinitní purifikace



Column: XK 16/60 packed with Superdex 75 prep grade
Sample: 1.0 ml of partially purified ZZ-brain IGF
Buffer: 300 mM ammonium acetate, pH 6.0
Flow rate: 0.5 ml/min (15 cm/h)

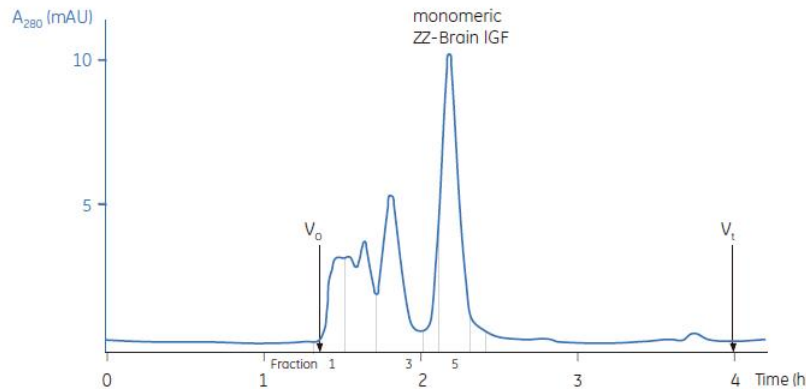


Fig 4.9. Example of polishing step: removal of dimers and multimers by GF.

Column: Mono S™ 5/50 GL
Sample: 14.5 ml of partially purified and desalted transposase TniA
Binding buffer: 20 mM MES pH 6.5, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT
Elution buffer: 20 mM MES pH 6.5, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 M NaCl
Flow rate: 1 ml/min
Gradient: 0%–100% elution buffer, 20 CV

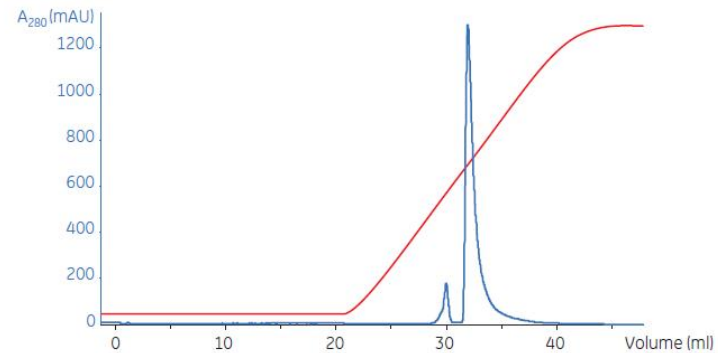


Fig 4.10. Example of polishing: removal of trace contaminants by high-resolution CIEC. Purification of the transposase TniA.

Základní zásady pro pořadí purifikačních kroků

- Na začátku zvolit metody s vysokou kapacitou a malým výtěkem a rozlišením → velké množství levného vstupního materiálu.
- Později metody s vysokým rozlišením a výtěkem, kapacita méně významná → ve vzorku již investovaná práce, množství proteinu je menší.
- Pokud možno sdílet metody za sebou racionálně, bez nutnosti mezikroků, jako je výměna pufru mezi jednotlivými separačními technikami
příklad: po precipitaci síranem amonným nebo iontoměnné chromatografii (protein je eluován z kolony za vysokých koncentrací soli) zvolit hydrofóbní chromatografii (vzorek dávkován na kolonu ve vysoké koncentraci soli)
- Jednotlivé separační metody pokud možno neopakovat.
- Čím méně kroků, tím větší výtěčnost proteinu.

Fúzní proteiny

Translační fúze sekvencí kódujících rekombinantní proteinů a

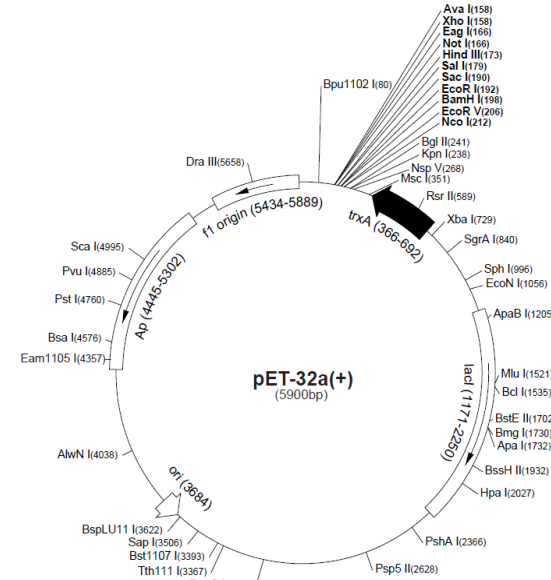
a) krátký peptid [p . (His)_n, (Asp)_n, (Arg)_n ...]

b) pirozený oligopeptid [p . MBP, GST, thioredoxin í]

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.

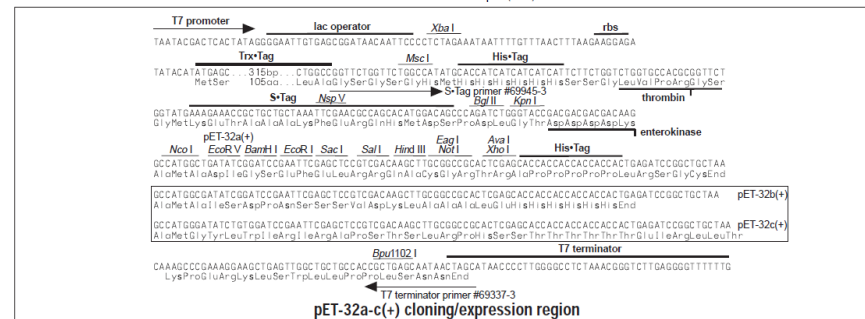


Úsna dn ní purifikace (uniformita purifikace)

Úzv ý-ení v ýt flku, rozpustnosti

Úmofln ní detekce , sekrece

Úfúzního partnera lze obvykle selektivn od-t pit.



Fúzní partner	Velikost	Umíst ní	Využití
His-tag	6, 8, or 10 aa	N-, C-, internal	purifikace
thioredoxin	109 aa (11.7 kDa)	N-,C-	purifikace, zvý-ení solubility proteinu
His-patch thioredoxin	109 aa (11.7 kDa)	N-,C-	purifikace, zvý-ení solubility proteinu
chloramfenikol acetyltransferasa	24 kDa	N-	sekrece, purifikace, detekce
avidin/streptavidin <i>Strep-tag</i>			purifikace, sekrece
glutathion-S-transferasa-GST	26 kDa	N-	purifikace
maltosu vázající protein (MBP)	40 kDa	N-, C-	purifikace, sekrece
zelen fluoreskující protein (GFP)	220 aa	N-, C-	detekce, purifikace

Odstran ní fúzního partnera (tagu) ó proteolytické -t pení

pRSET B Multiple Cloning Site

21 T7 promoter RBS
 AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA

91 Polyhistidine (6xHis) region
 GATATACAT **ATG** CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

148 T7 gene 10 leader Xpress™ Epitope BamH I Xho I Sac I
 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCG ACC TCG
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
EK recognition site EK cleavage site

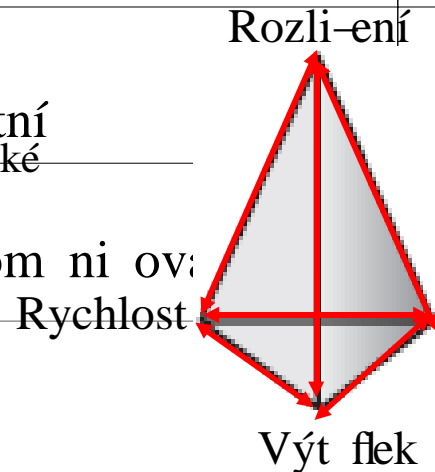
205 Bgl II Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III
 AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC
 Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

261 T7 reverse priming site
 GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA

Enzyme	Cleavage site
Enterokinase	DDDDK*
Factor Xa	IDGR*
Thrombin	LVPR*GS
PreScission	LEVLFQ*GP
TEV protease	EQLYFQ*G
3C protease	ETLFQ*GP
Sortase A	LPET*G
Granzyme B	D*X, N*X, M*N, S*X

Fúzní kotvy (tagy) využívané se k purifikaci

Kotva (tag)	Typ chromatografie	Princip separa ní techniky
poly [His]	afinitní	vazba na kov
IgG vazná doména	afinitní	vazba na protilátku
Poly [Asp]	iontom ni ová	vazba na anion vázající matrici
Poly [Phe]	hydrofóbní	vazba na hydrofóbní matrici
<i>Strep-tag</i> Separa ní techniky charakteristické rovnováhou všech parametr .	afinitní	vazba na streptavidin
Poly [Arg]	iontom ni ová	vazba na kation vázající matrici



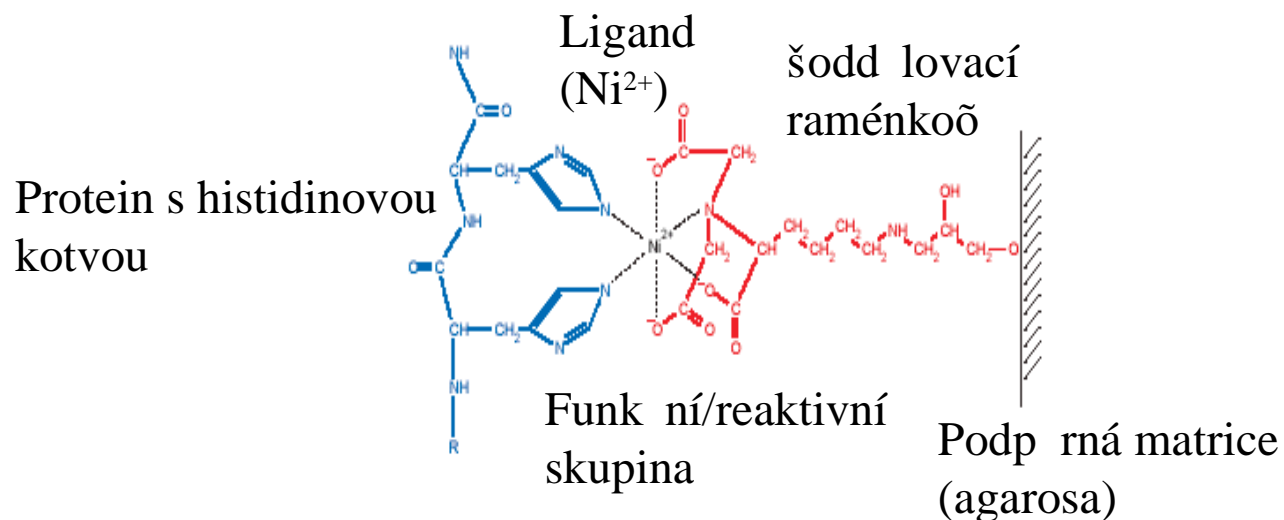
Metalochelata ní afinitní chromatografie

ÉR.1975- uvedl Porath a kol. metodu frakcionace sérových proteinů.

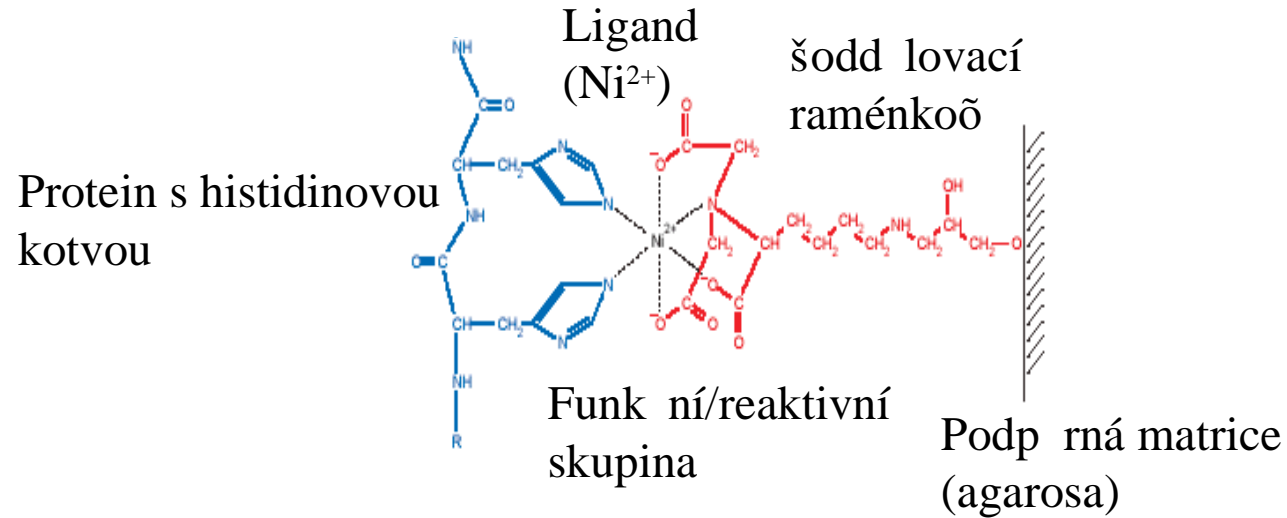
ÉKonstrukce umělých **oligohistidinových domén (poly [His])** fúzovaných k N- nebo C- konci proteinu metodami molekulární biologie.

ÉNyní jeden ze základních purifikačních postupů rekombinantních proteinů.

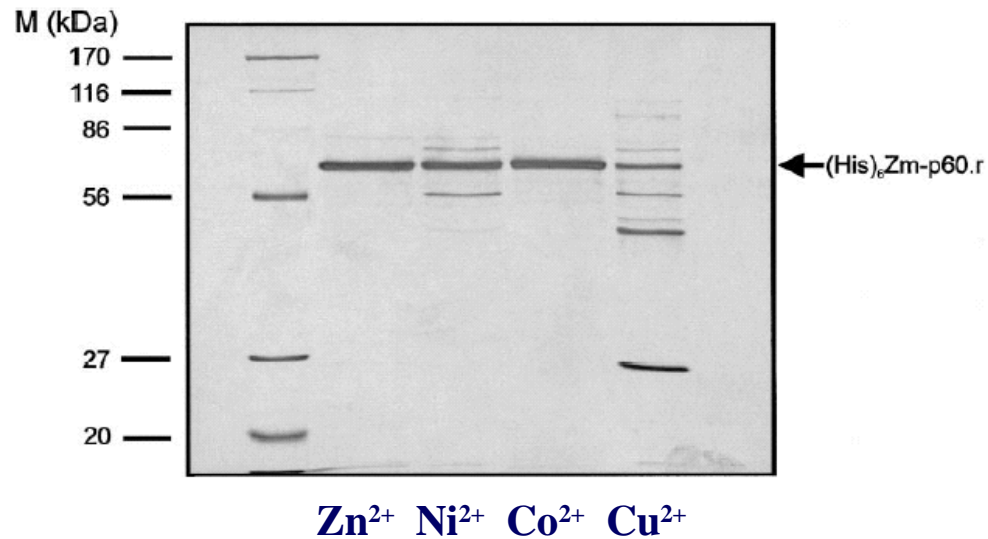
ÉInterakce proteinu s maticí je zprostředkována neobsazenými d-orbitály iontu přechodných kovů, které váží volné elektronové páry p-ovální z dusíkového atomu imidazolových skupin histidinových zbytků v proteinu.



Matrice pro metalochelata ní afinitní chromatografii

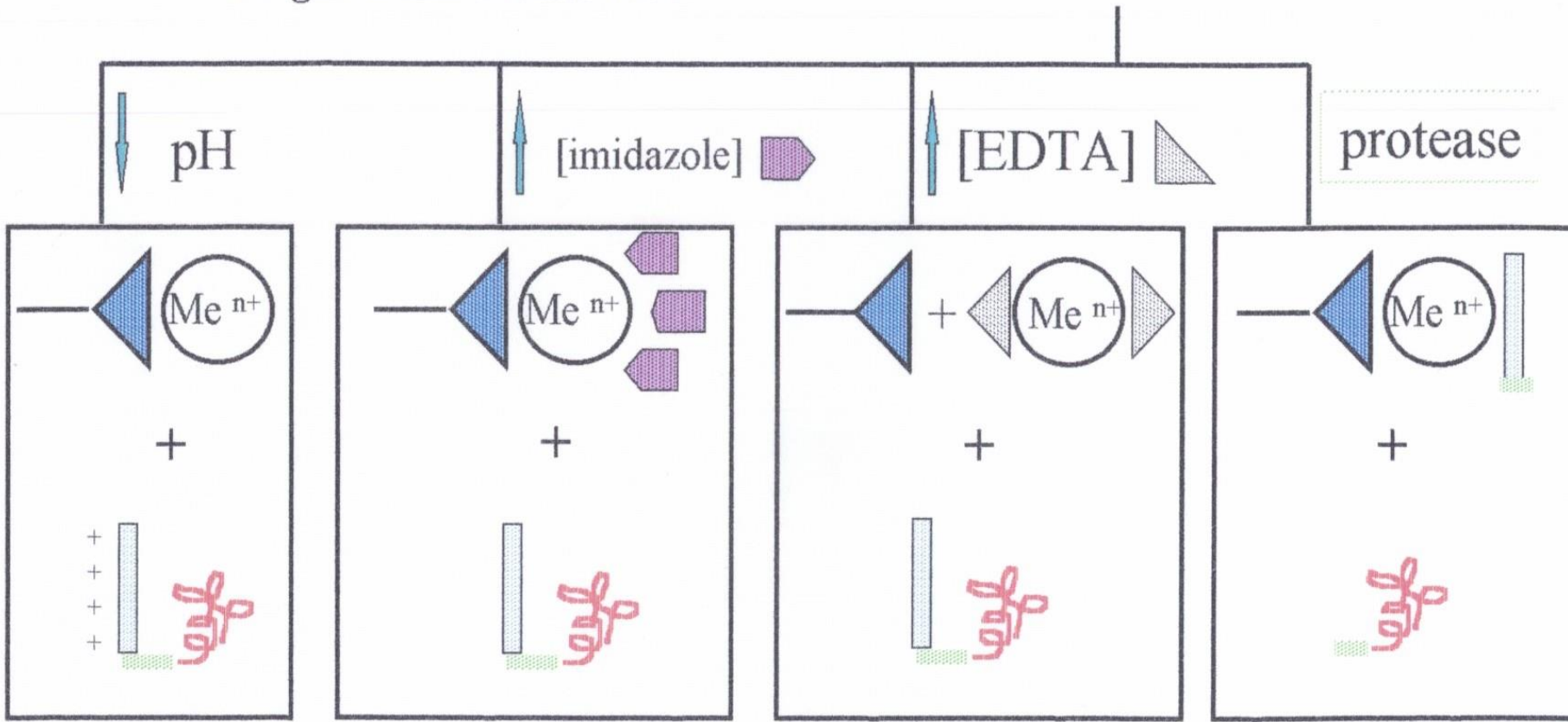
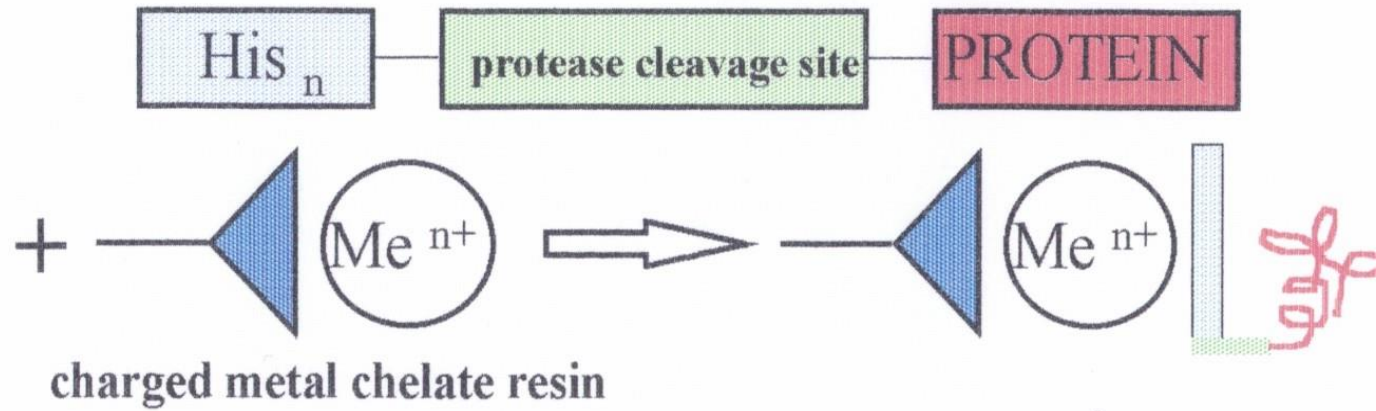


Efekt kovového iontu navázaného na matrici



Síla vazby: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \sim \text{Co}^{2+}$

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)



Metalochelata ní afinitní chromatografie

Purifikace za nativních podmínek

Protokol nativní IMAC konkrétního proteinu je z části nepenosný na jiné proteiny!

Obecně lze navrhnout:

- ➡ Pufry o pH 7-8 pro vazbu rek. proteinu s kovovým iontem
- ➡ Pufry s vysokou koncentrací solí (např. 0,5-1 mol/l NaCl)
- ➡ Nižší koncentrace imidazolu nebo snížení pH pro odstranění balastních proteinů
- ➡ Eluce použitím gradientu imidazolu (0-1 mol/l), výrazným snížením pH nebo vyufitím EDTA

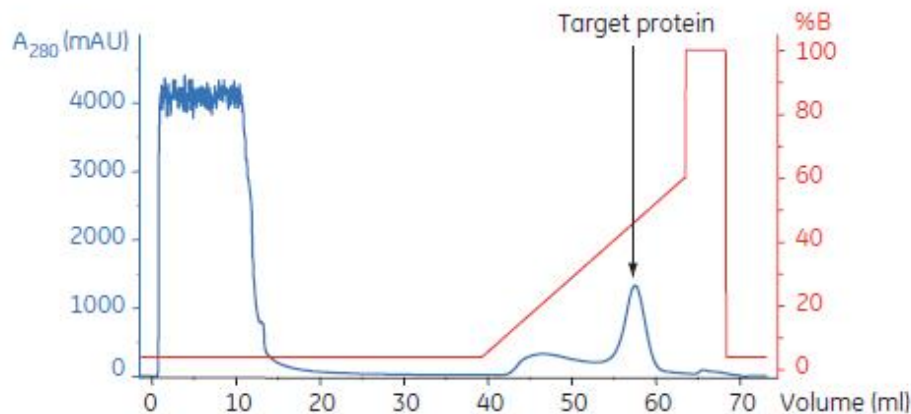


Fig 2.3. Typical IMAC purification with gradient elution.

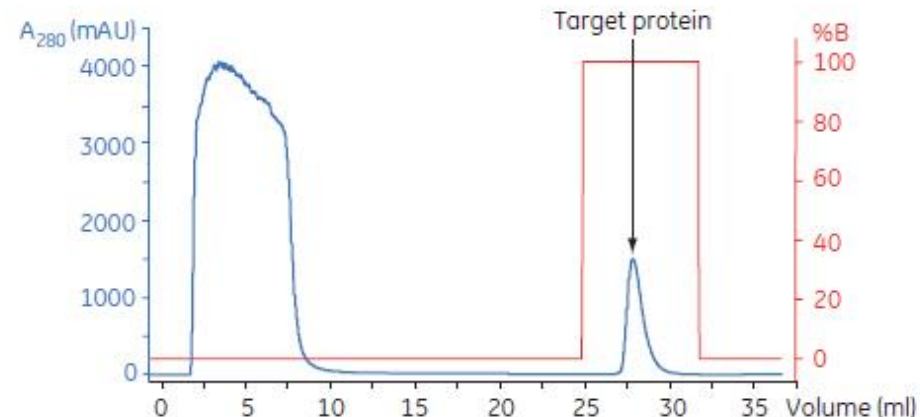


Fig 2.4. Typical IMAC purification with step elution.

Metalochelata ní afinitní chromatografie

Purifikace za denatura níh podmínek

Denatura ní IMAC ó purifikace protein v inkluzních t liscích

- ➔ Purifikace za vysokých koncentrací mo oviny nebo guanidinium chloridu
 - istý protein, ale poru-ení kvartérní struktury (posta í v-ak nap . na imunizace)

Získ nativního konformeru: - Nutné pro m ení enzymové kinetiky, rtg analýza,í

- Eluce proteinu z kolony a jeho renaturace dialýzou nebo výrazným z ed níh v renatura níh pufrech

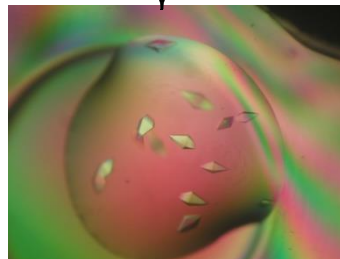
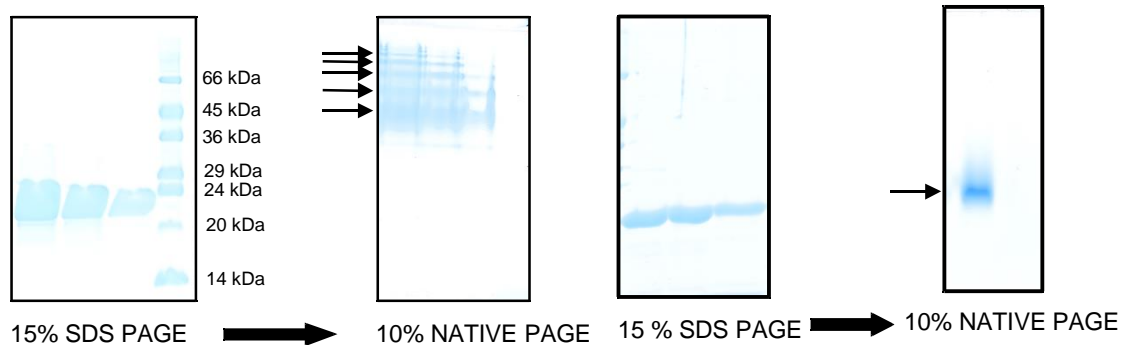
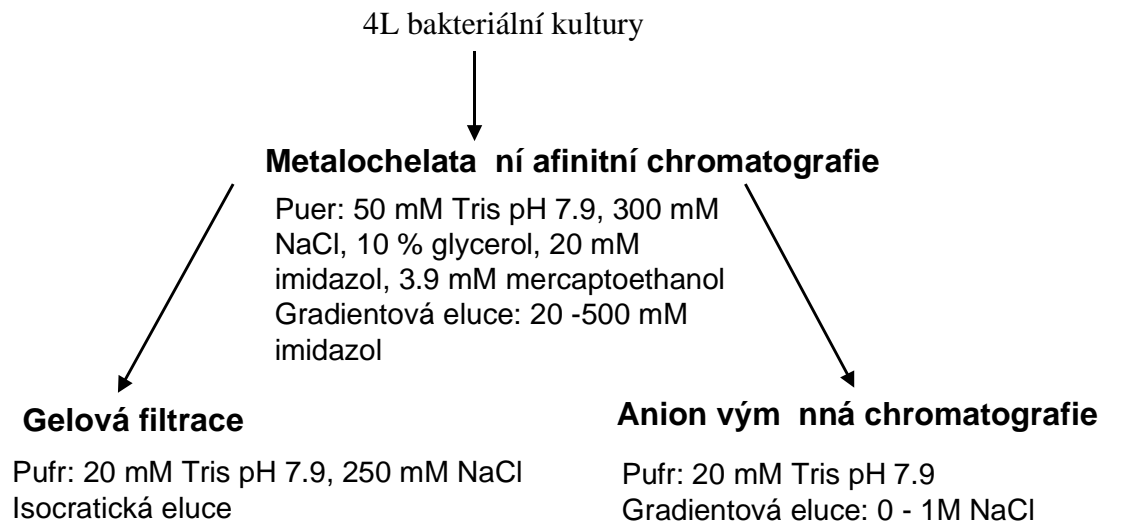
- Renaturace enzymu vázaného na matrici:

➔ Gradient z denatura níh do renatura níh pufri



Pulzní renaturace

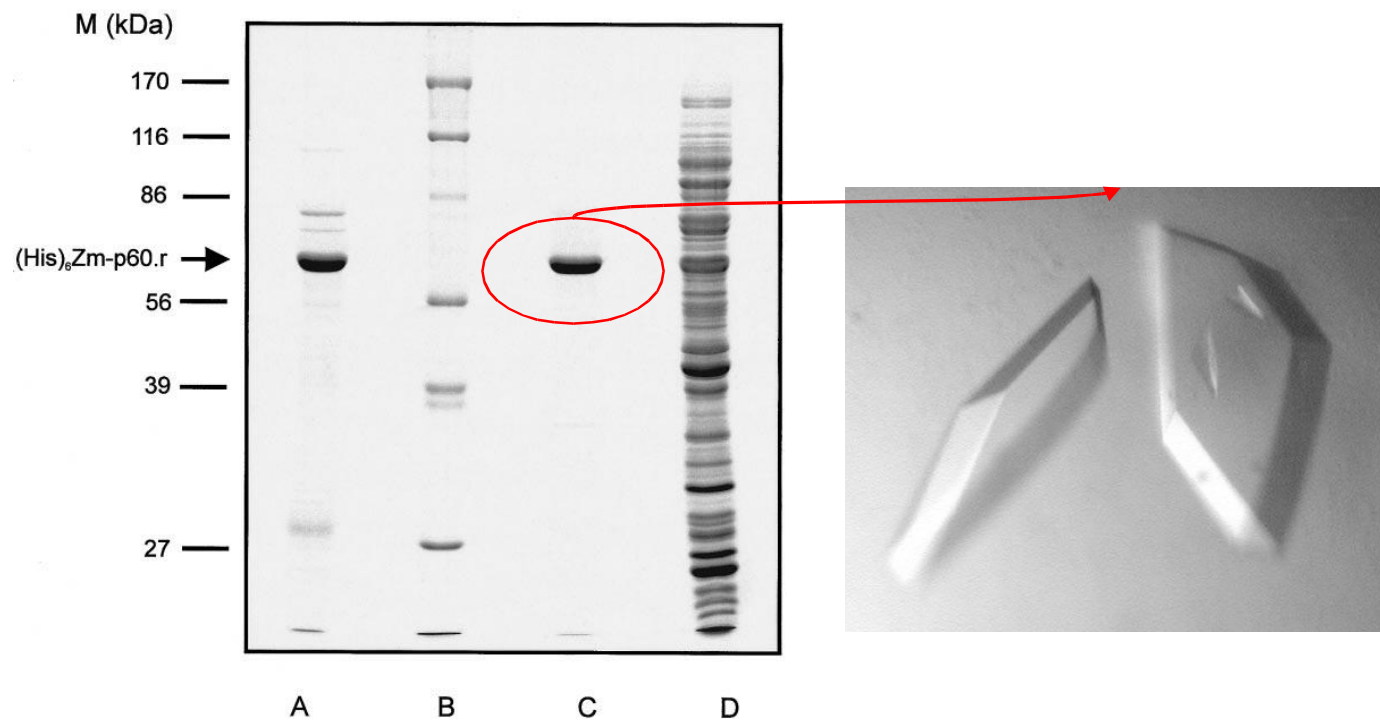
Purifikace proteinu AHP2 (Arabidopsis histidin phosphotransfer protein 2)



His-tagged protein and IMAC under native conditions

One-step purification of maize β -glucosidase

- Perfusion matrix: POROS MC/M
- Functional group: iminodiacetate, metal ion Zn^{2+}
- Removing contaminated proteins: linear gradient of imidazole (0-50 mM) and pH (pH 6.1-7)
- Protein elution: 0.1 M EDTA
- 80% recovery, 95 fold purification
- Common production and isolation of wild type protein and soluble mutant form for enzymatic measurements and crystallization.



(Zouhar et al., 1999)

Doporu ená literatura

Makrides SV (1996) **Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli***. Microb.Review 60, (512-538).

Simpson RJ=Adams PD=Golemis E

Basic methods in protein purification and analysis: a laboratory manual,
Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009,
436 s., ISBN 978-0-87969-868-3

