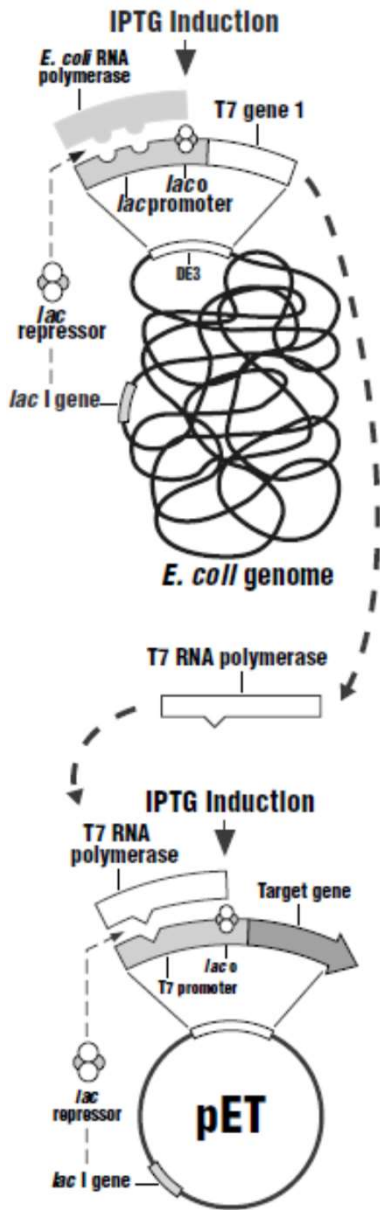


Expresa rekombinantních proteinů



Rekombinantní proteiny

Rekombinantní DNA je umělá DNA sekvence, která vznikla novou kombinací dvou nebo více 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 proteinů

1. V základním výzkumu:

- **Biochemická funkční charakteristika 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 či ligand -proteinové interakce)
- **Strukturní analýza** (NMR, krystalografie, kryo-EM)
- **Proteinové inženýrství** (zlepšení vlastností proteinů – aktivita, stabilita)

2. V průmyslu:

- **např. léky, vakcíny, proteiny pro diagnostiku, potravinové doplňky,.....**

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

Zachování biologické aktivity

Proč vyrábět rekombinantní proteiny?

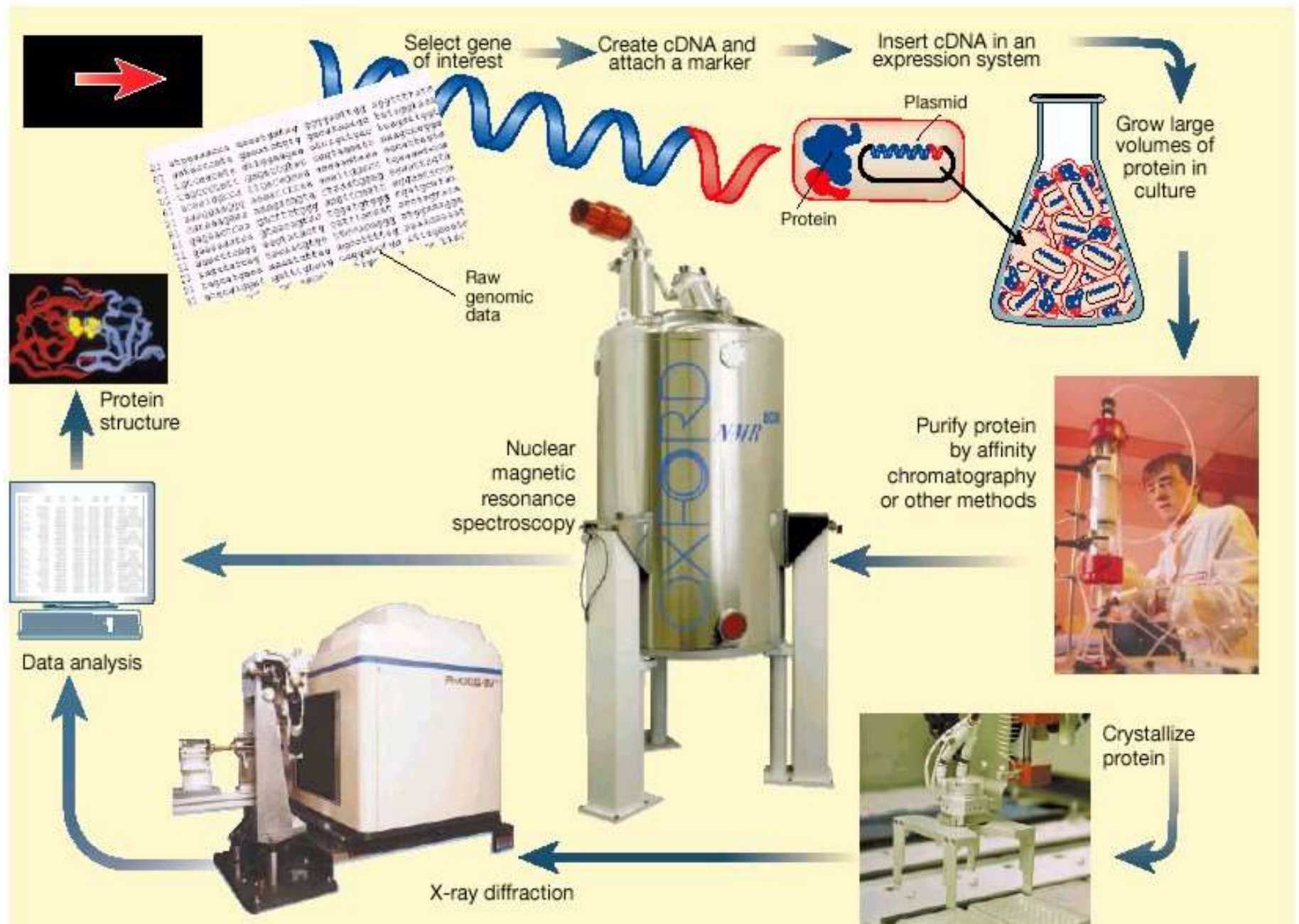
- Přirozený zdroj:**
- Obtížně se získává (tkáně, orgány).
 - Obtížně se kultivuje (bakterie, viry, tkáňové kultury).
 - Limitovaná exprese
 - Často obtížná purifikace proteinu (mnohokroková)
 - Možná infekční rizika v průběhu izolace nebo ve výsledném produktu

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 Nica (1980)

Technologie rekombinantních proteinů



Hostitelský organismus pro expresi rekombinantních proteinů

- Prokaryotní expresní systémy (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, ...)
- Kvasinky (*Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*,
- Savčí buňky (linie ovariálních buněk křečka čínského- CHO buňky, linie lidských embryonálních ledvinových buněk-HEK,...)
- Hmyzí buňky s bakuloviry
- Expres proteinu *in vitro* (lyzáty z králičích retikulocytů, extrakty z pšeničných klíčků, extrakty z *E.coli*)



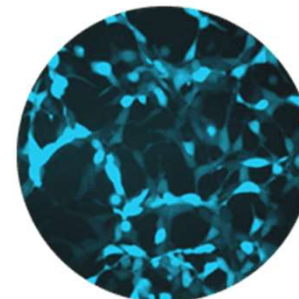
Bacteria
Expression
System



Yeast
Expression
System



Insect
Expression
System



Mammalian
Expression
System

Kritéria pro výběr hostitelského organismu pro expresi rekombinantních proteinů

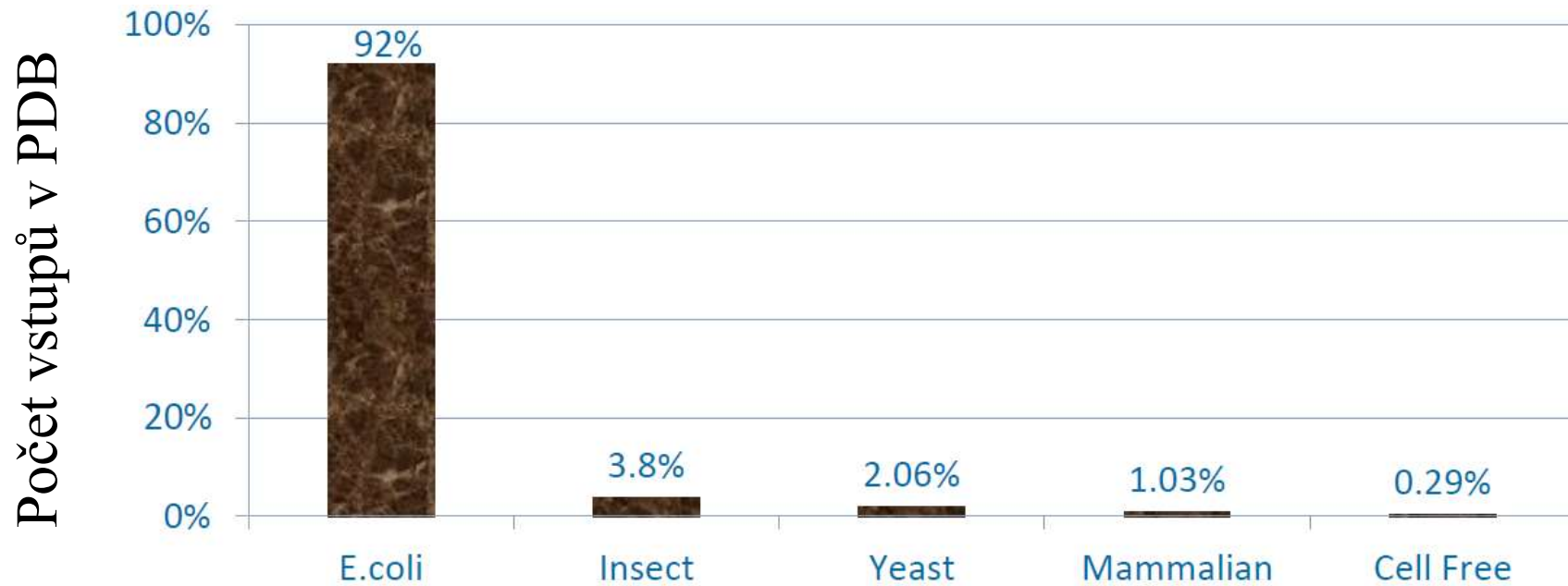
Expresní systém	Posttranslační modifikace					
	N-glykosylace	O-glykosylace	Fosforylace	Acetylace	Acylace	γ -karboxylace
<i>E. coli</i>	chybí	-	-	-	-	-
Kvasinky	vysoce manosilované glykany	+	+	+	+	-
Hmyzí buňky	jednoduchá, bez sializace	+	+	+	+	-
Savčí buňky	komplexní	+	+	+	+	+

Post-translační modifikace mají vliv na folding proteinu, rozpustnost, stabilitu, transport, imunogenicitu a funkční aktivitu proteinu.

Kritéria pro výběr hostitelského organismu pro expresi rekombinantních proteinů

Expresní systém	Náklady na kultivaci	Rychlost růstu	Úroveň exprese	Konformace proteinu
<i>E. coli</i>	nízké	vysoká	vysoká	často nutný refolding
Kvasinky	nízké	vysoká	nízká až vysoká	někdy nutný refolding
Hmyzí buňky	vysoké	nízká	nízká a vysoká	většinou správná
Savčí buňky	vysoké	nízká	většinou nízká	většinou správná

Statistika v PDB



Organismus použitý pro expresi

Jedná se o přibližné hodnoty z roku 2014

<https://www.rcsb.org/stats/distribution-expression-organism-gene>

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

VÝHODY :

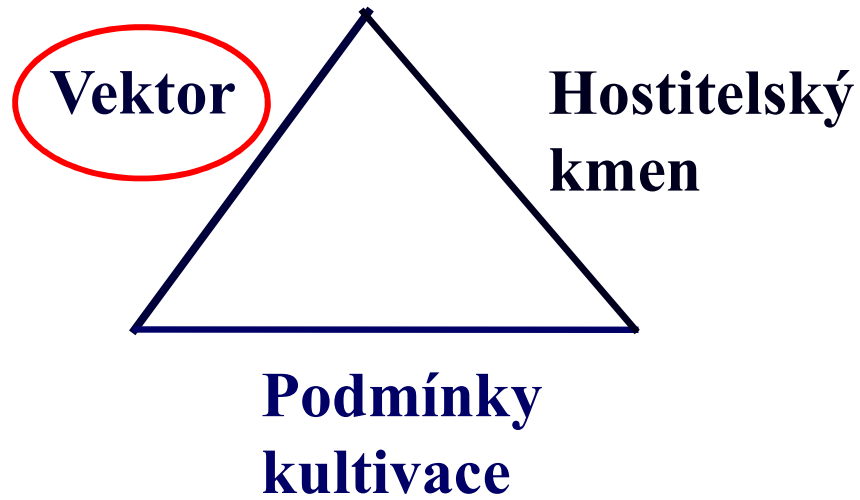
- Vysoká produkce rekombinantních proteinů
- Dobře prostudovaný genom a proteom-usnadnění genových manipulací
- Design řady vektorů usnadňuje klonování a expresi cizích genů
- Rychlý růst v poměrně levném médiu
- Přizpůsobivost systému

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

NEVÝHODY:

- Potřeba cDNA zkoumaného proteinu
- Absence eukaryotických posttranslačních systémů (posttranslačních modifikací)
- Tvorba inkluzních tělísek (nerozpustná forma proteinu)
- Omezená schopnost tvorby disulfidických vazeb
- Preferují jiný genetický kód než vyšší eukaryota
- Kontaminace proteinů lipopolysacharidem (endotoxin)
- Chybí sekreční mechanismus pro účinné uvolňování proteinu do kultivačního média

Expresní systém *E.coli*



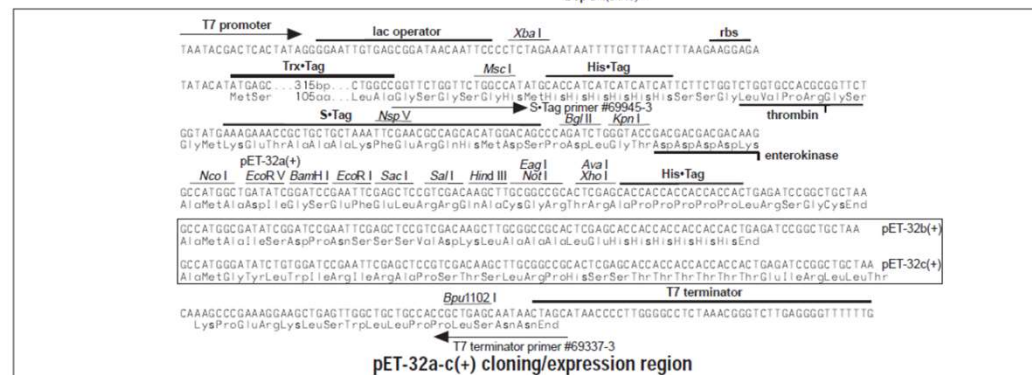
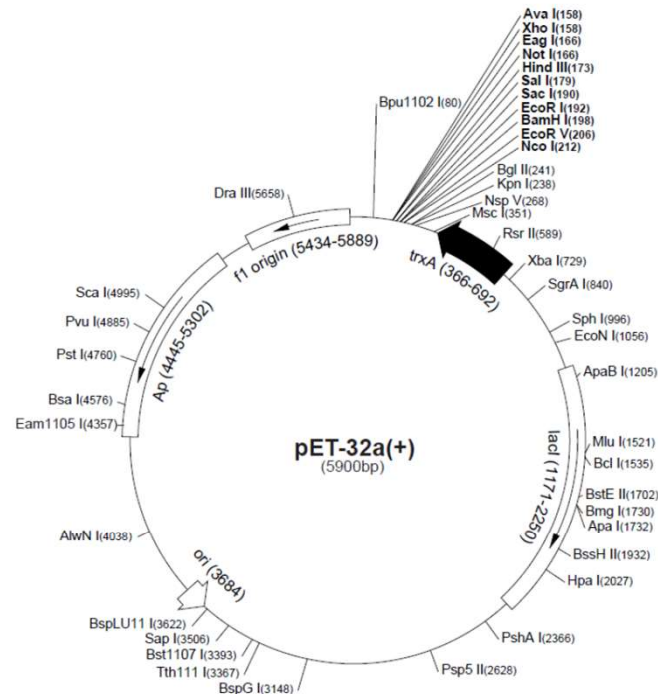
Expresní vektor

= klonovací vektor, který obsahuje nezbytné regulační sekvence k tomu, aby podporoval expresi inzertů 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>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*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.



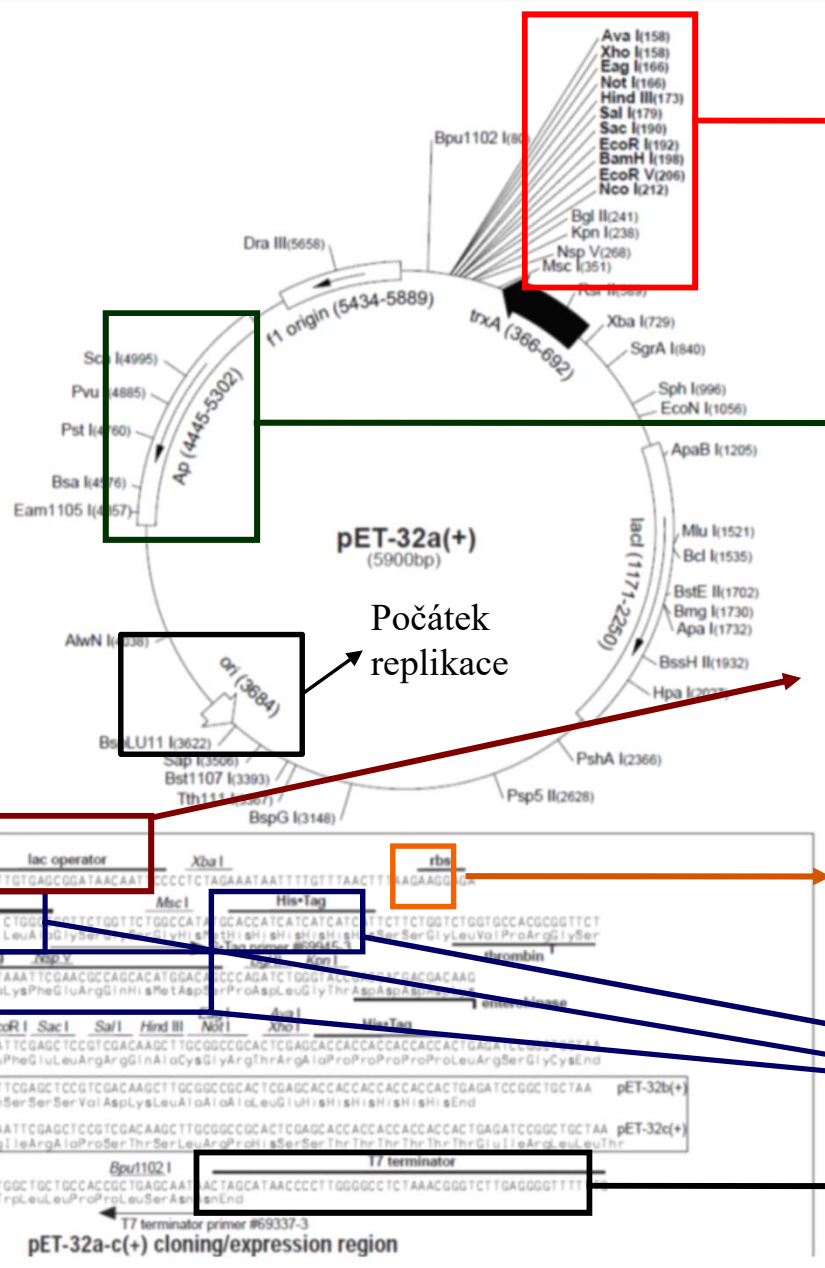
pET-32a-c(+) cloning/expression region

Struktura vektoru pro účinnou 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
<i>f1</i> 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(209)
Nco I(212)

Klonovací místo

Gen pro rezistenci k antibiotiku (ampicilin)

promotor

Počátek replikace

Operátor - vazebné místo pro represor

Ribozom-vazebné místo

Fúzní/purifikační značky/kotvy

Transkripční terminátor

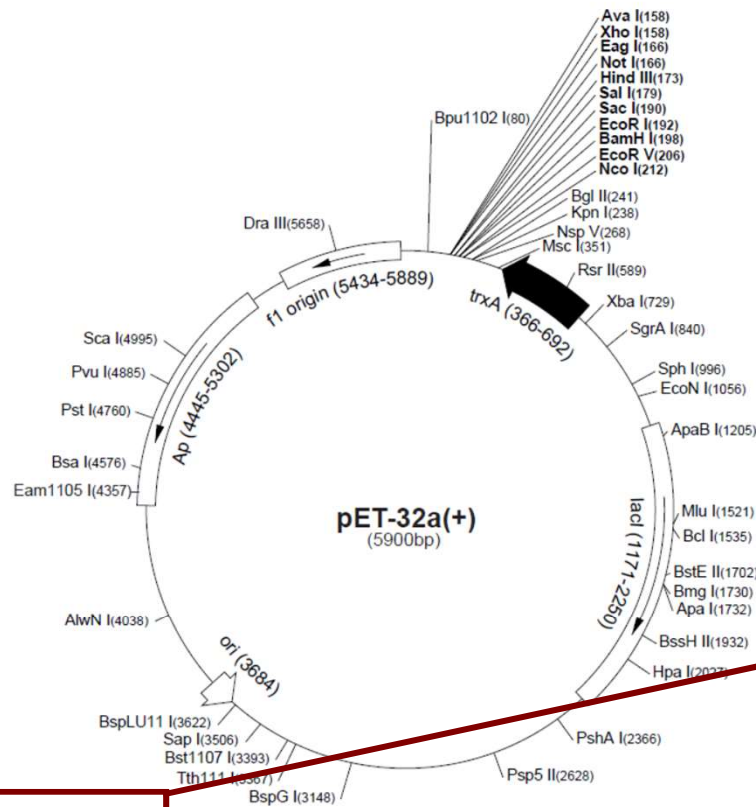
pET-32a-c(+) cloning/expression region

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

pET-32a(+) sequence landmarks

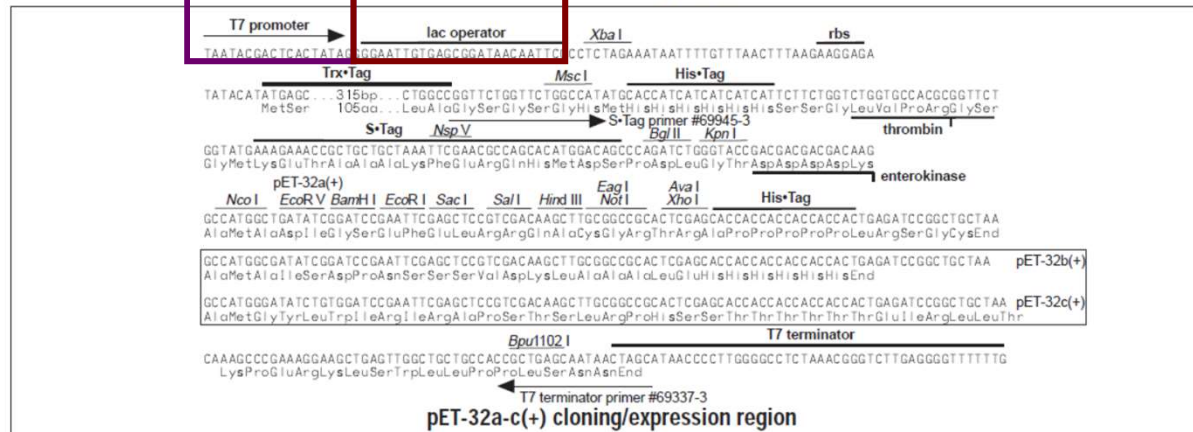
T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin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

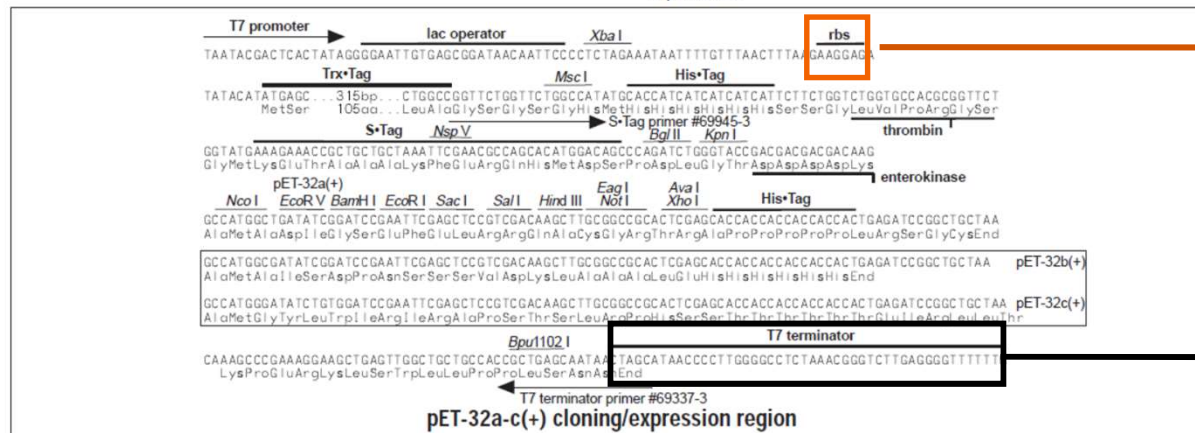
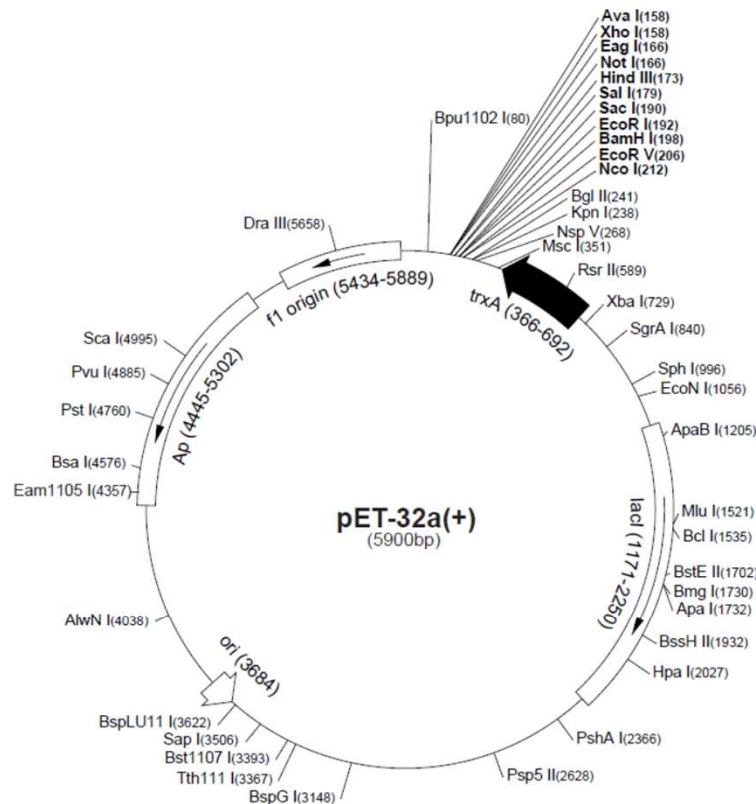
- **Silný promotor** (ptac, ptrp, λ pL, pT7)
 - Protein zájmu by měl tvořit 10-30% a více z celkového bakteriálního proteinu.
- **Přenositelný do různých kmenů *E.coli***
- **Jednoduše a levně inducibilní**
 - Teplotní indukce (λ pL)
 - Chemická indukce (ptac, ptrp, pT7): IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid)
- **Vykazuje minimální hladinu bazální exprese**
 - Pokud jsou proteiny netoxické dosahuje se vysokých výtěžků proteinů růstem buněk do vysokých hustot s následnou indukcí aktivity promotoru.
 - U toxických proteinů je nutná minimalizace bazální transkripce před přidáním indukčního činidla pomocí vhodného represoru.

Struktura vektoru pro účinnou 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
<i>f1</i> origin	5434-5889

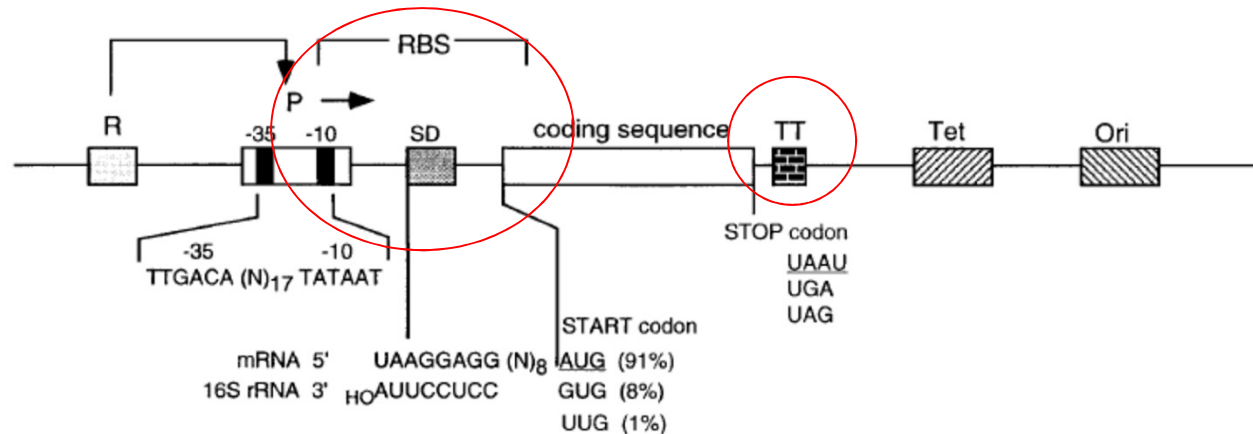
The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



Ribozom-vazebné miesto

Transkripční terminátor

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



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

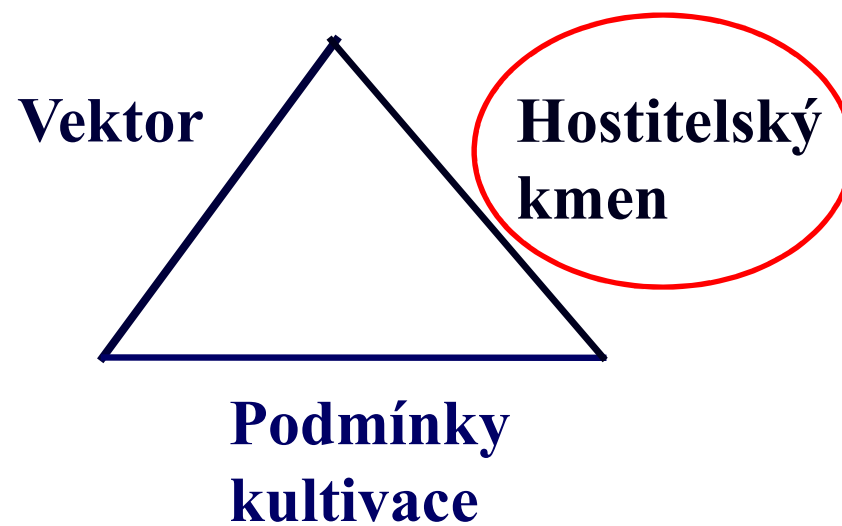
Vzdálenost mezi SD sekvencí a iniciačním kodonem AUG je 4-13 nukleotidů, tato vzdálenost ovlivňuje účinnost iniciace translace (**optimální vzdálenost je 4-8 nukleotidů**), oblast bohatá na AT páry.

Transkripční terminátor

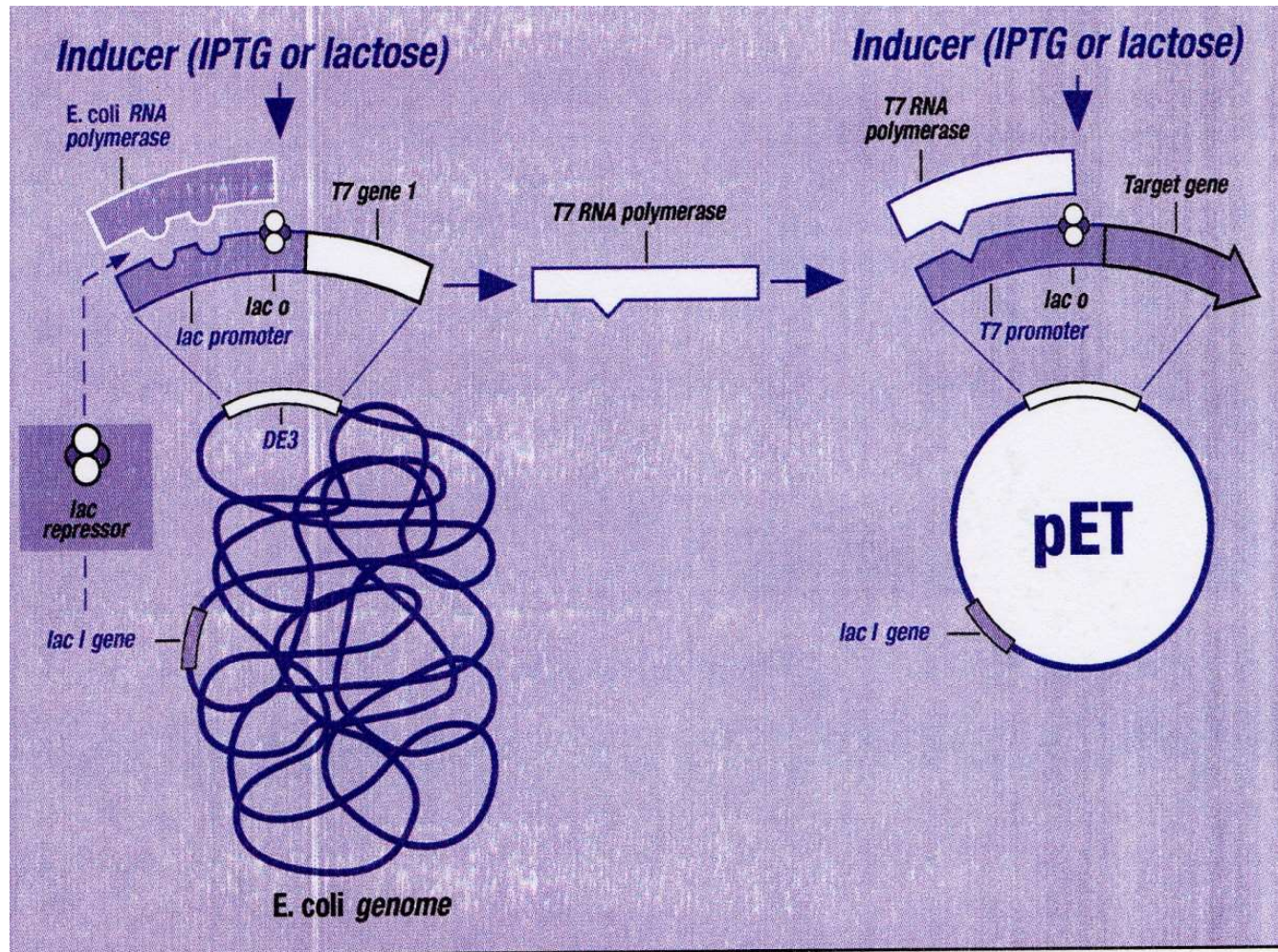
T₇ term, rrnT1, T2

(zabraňuje okluzi promotoru, zvyšuje stabilitu mRNA)

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



Indukce exprese rekombinantního proteinu v hostitelském kmeni *E. coli* (BL21(DE3))



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



- Toxicita není omezena na pouhý fakt, že je protein je pro buňku cizí, ale může být způsobena i tím, že je nadprodukován určitý nativní gen.
 - Nutná přísná regulace expresního systému

Komerčně dostupné bakteriální kmeny s různými úrovněmi regulace exprese, zajišťujícími snížení bazální exprese.

BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

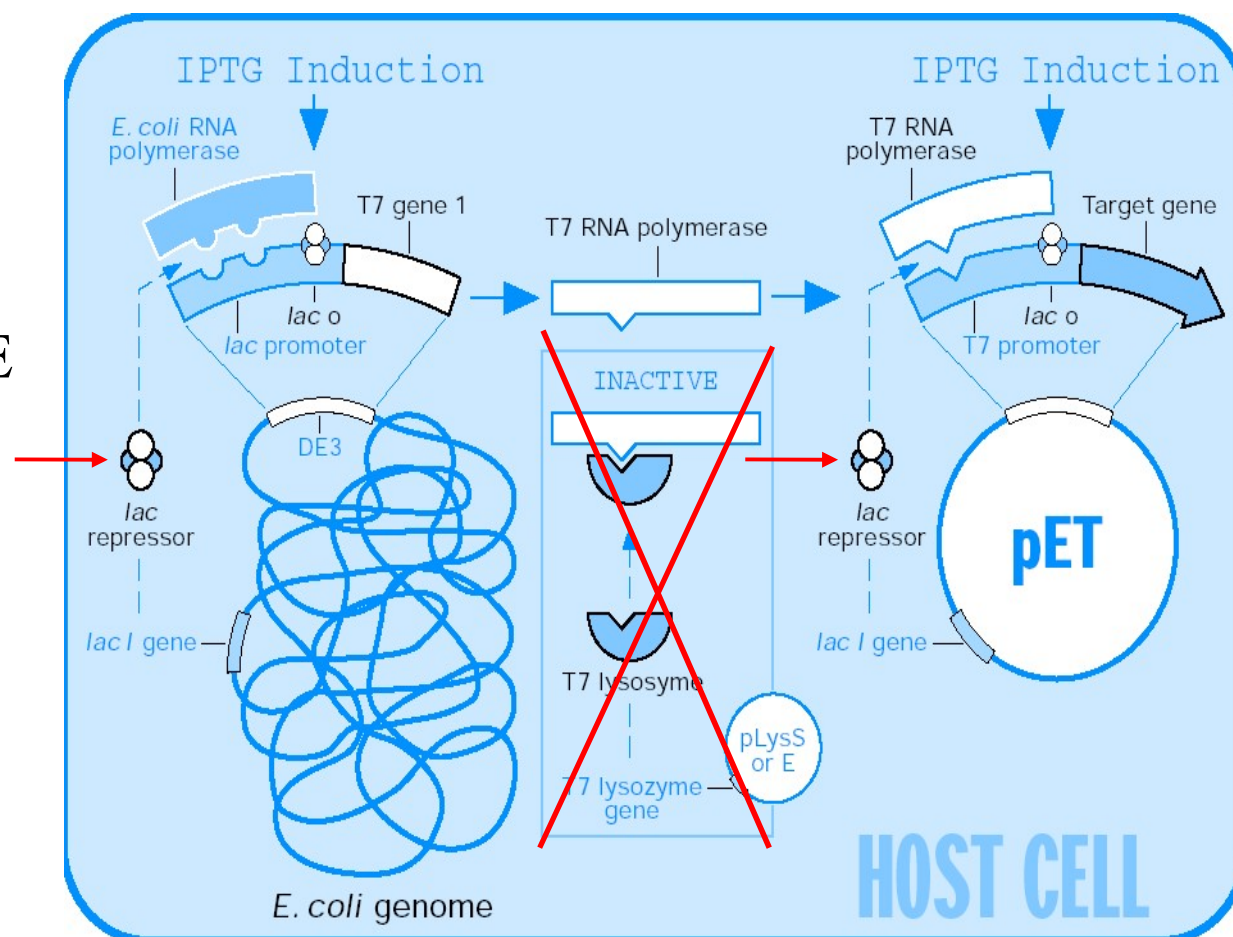
BL21

Různé úrovně minimalizace bazální exprese

✓ **BL21(DE3)**

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



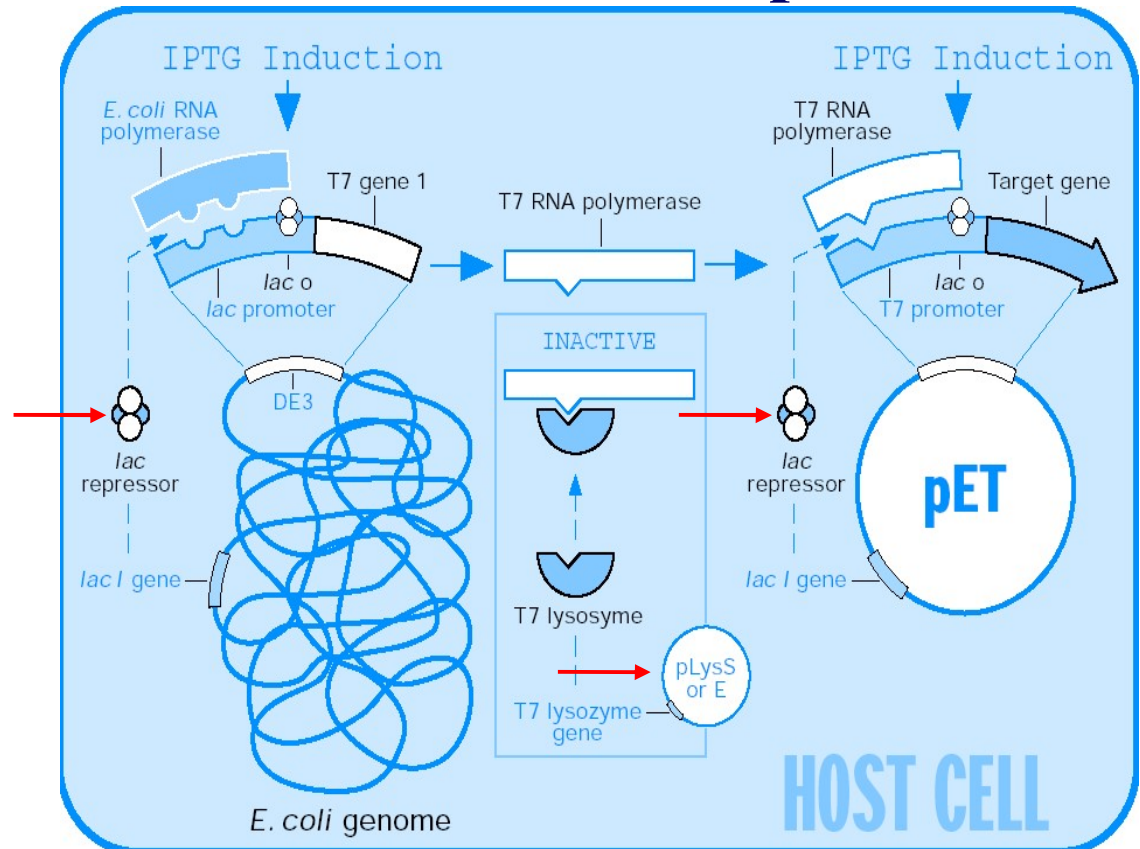
Cca 10 % hladina bazální exprese (před indukcí exprese) klonovaného genu.

Různé úrovně minimalizace bazální exprese

BL21(DE3)

✓ **BL21(DE3)pLysS/E**

BL21



- Expresní kmen obsahující plazmidy pLysS nebo pLysE umožňující přísnou regulaci expresního systému využívající T7 promotor. Tyto plazmidy kódují lysozym, který se váže na T7 RNA polymerasu a inaktivuje ji a snižuje tak bazální expresi.

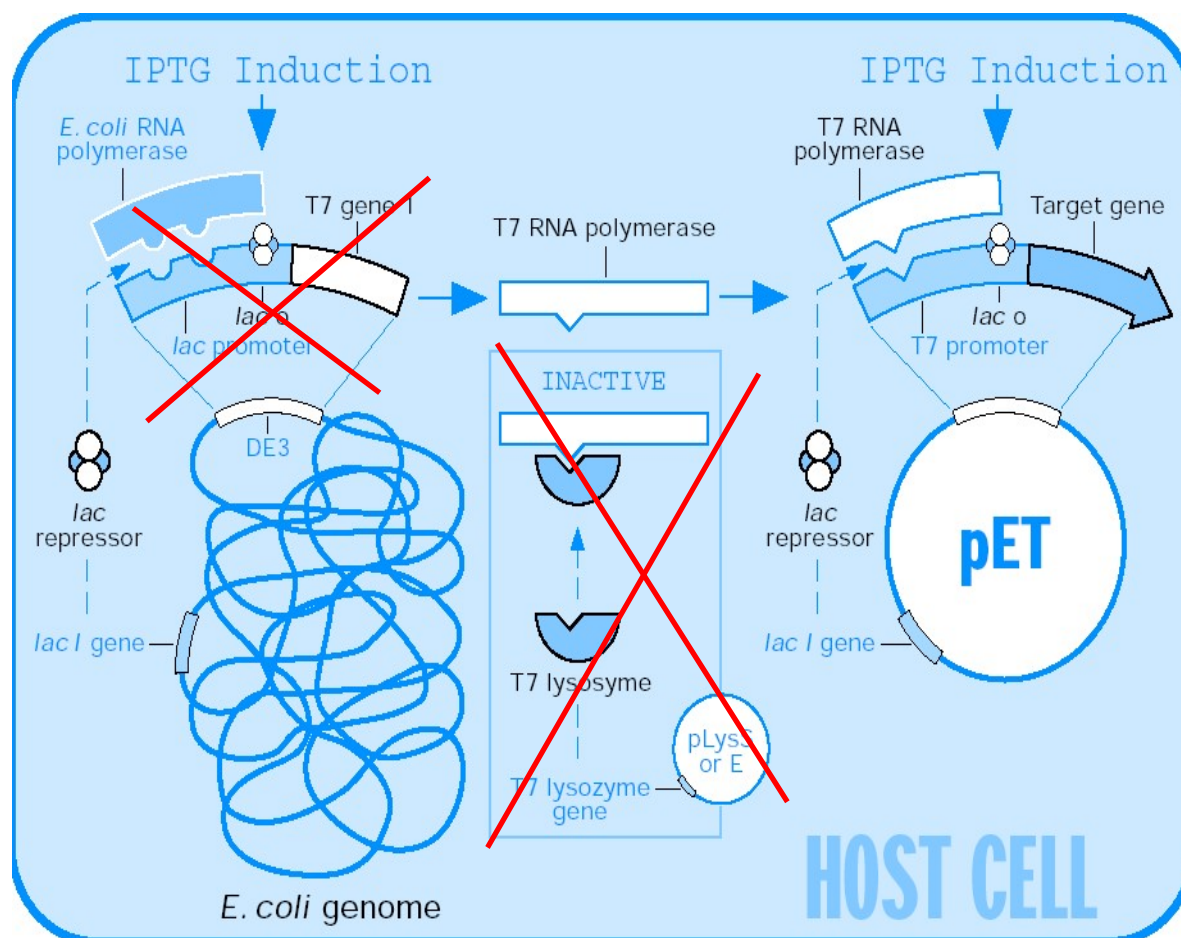
Cca 1-3% hladina bazální (před indukci exprese) exprese klonovaného genu.

Různé úrovně minimalizace bazální exprese

BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

✓ **BL21**

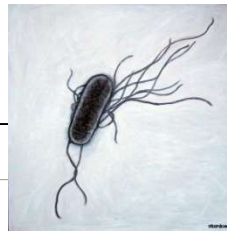


- Indukce exprese infekcí bakteriofágem CEG (gen pro T7 RNA polymerasu)

Nejvyšší úroveň represe!!

Využívání kodonů *E.coli* (codon usage)

- Geny u prokaryot a eukaryot se vyznačují nenáhodným využíváním synonymních kodonů.
- Kodony málo využívané u *E. Coli* se mohou hojně vyskytovat u heterologních genů pocházejících z eukaryot, archebakterií aj.
- Frekvence využití synonymních kodonů obvykle odráží zastoupení jejich tRNA v cytoplasmě.



Escherichia coli K12 [gbtct]: 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 [gbpln]: 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 genů obsahujících málo preferované kodony vede k translačním chybám !

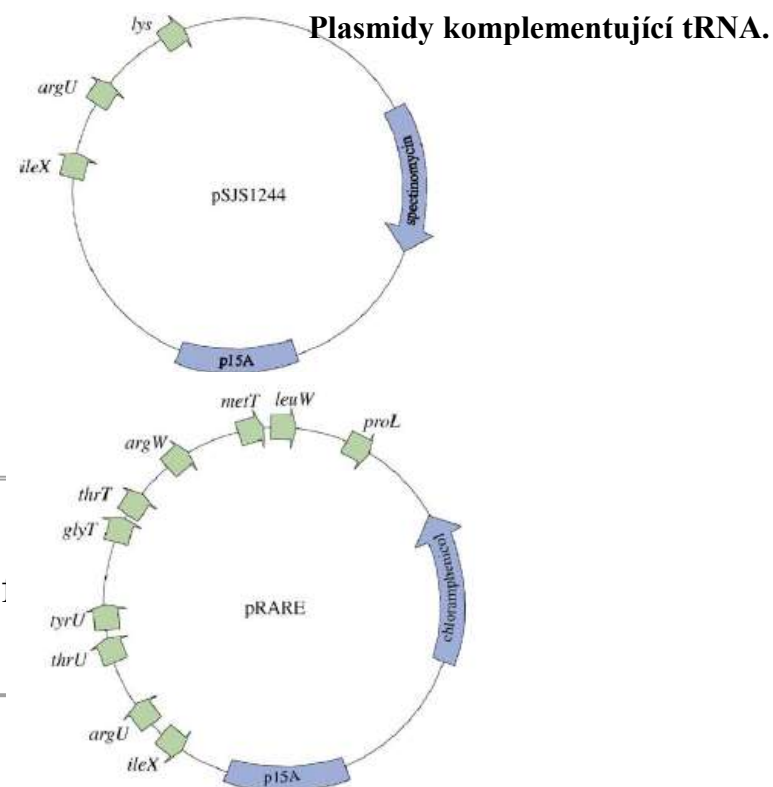
- Předčasné ukončení translace (zkrácený produkt)
- Posunutí čtecího rámce (posun až o 2 AK v místě kodonu AGA)
- Záměna aminokyseliny - často arginin (kodon AGA) za lyzin

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



NEBO: Místně řízená mutageneze - záměna málo využívaného kodonu nebo syntéza optimalizovaného genu (optimalizace pro produkci v jednom nebo více organismů s ohledem na stabilitu RNA a vznik sekundárních struktur)

Degradace proteinu

Bakteriální proteolytický systém:

- *E. coli* obsahuje velké množství proteas, nejvíce v cytoplazmě
- Selektivně odstraňuje „abnormální“ proteiny:
 - Nekompletní polypeptidy
 - Proteiny se zaměněnými AK
 - Nadměrně syntetizované podjednotky multimerních proteinů
 - Proteiny poškozené oxidací nebo volnými radikály
 - Cizí, rekombinantní proteiny (problémem jsou proteiny < 8 kDa)

Aminokyseliny redukující stabilitu heterologního proteinu

1. N-koncové pravidlo

- Stabilita proteinu je ovlivněna aminokyselinou, která následuje první aminokyselinu polypeptidového řetězce (methionin).
- Aminokyseliny na této pozici redukují stabilitu proteinu:

Arg, Lys, Leu, Phe, Tyr a Trp

- Poločas rozpadu proteinu pouze 2 min

2. Lysin ve vnitřní sekvenci poblíž N-konce proteinu

- Degradace ubiquitin-dependentními proteasami

3. PEST hypotéza

- Oblasti bohaté na Pro (P), Glu (E), Ser (S), Thr (T)
- Po fosforylaci PEST degradace proteinu Ca-dependentními proteasami

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



Kmeny deficientní na proteasy

- Mutace, eliminující produkci proteas a tím proteolytickou degradaci rekombinantních proteinů.

Expresní kmeny **BL21** jsou deficientní na:

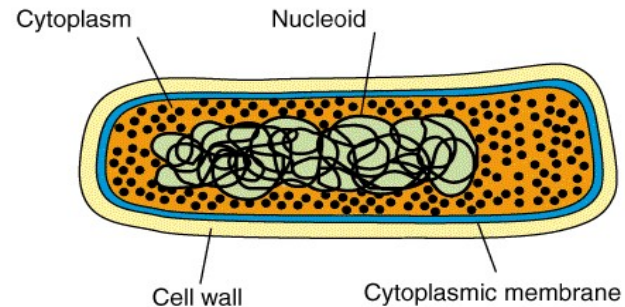
cytoplazmatickou proteasu *lon*
periplazmatickou proteasu *ompT*

Cílená exprese proteinu

Cytoplazmatická exprese

Periplazmatická exprese

**Extracelulární exprese
(do kultivačního média)**



Cytoplazmatická exprese

- Preferovaný způsob

Výhody

- Vysoký výtěžek proteinu
- Jednodušší plazmidové konstrukty
- Inkluzní tělíska

Nevýhody

- Inkluzní tělíska
- Redukční prostředí
- Proteolýza
- Více komplexní purifikace

Inkluzní tělíska

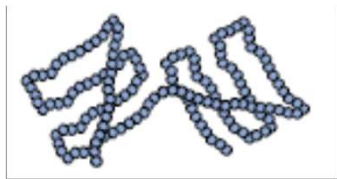
Nerozpustné shluky (cca $2\mu\text{m}^3$) složené z nativních proteinů s nízkou rozpustností, z nesložených nebo z částečně poskládaných proteinů

Co způsobuje jejich tvorbu?

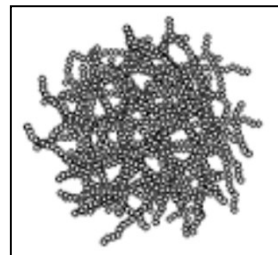
1. Prostředí v *E.coli* se liší od přirozeného prostředí ve smyslu redoxního potenciálu (redukující prostředí v cytoplazmě *E.coli*), pH, osmolarity, absence chaperonů, kofaktorů, absence post-translačních modifikací

2. Vysoká hladina exprimovaných proteinů

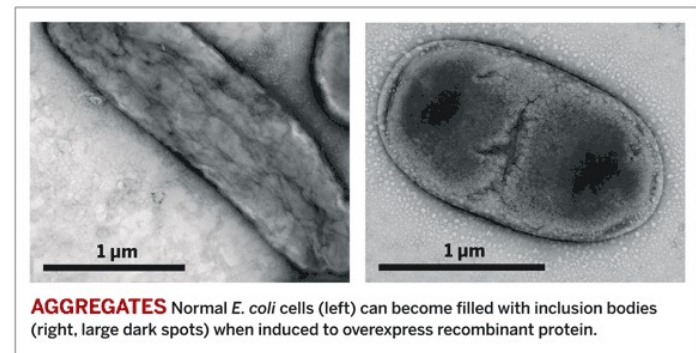
- exponované hydrofóbní domény nesbalených polypeptidových řetězců navzájem (intramolekulárně) asociují



Rozpustný protein



Inkluzní tělíska – nerozpustný protein



Inkluzní tělíska

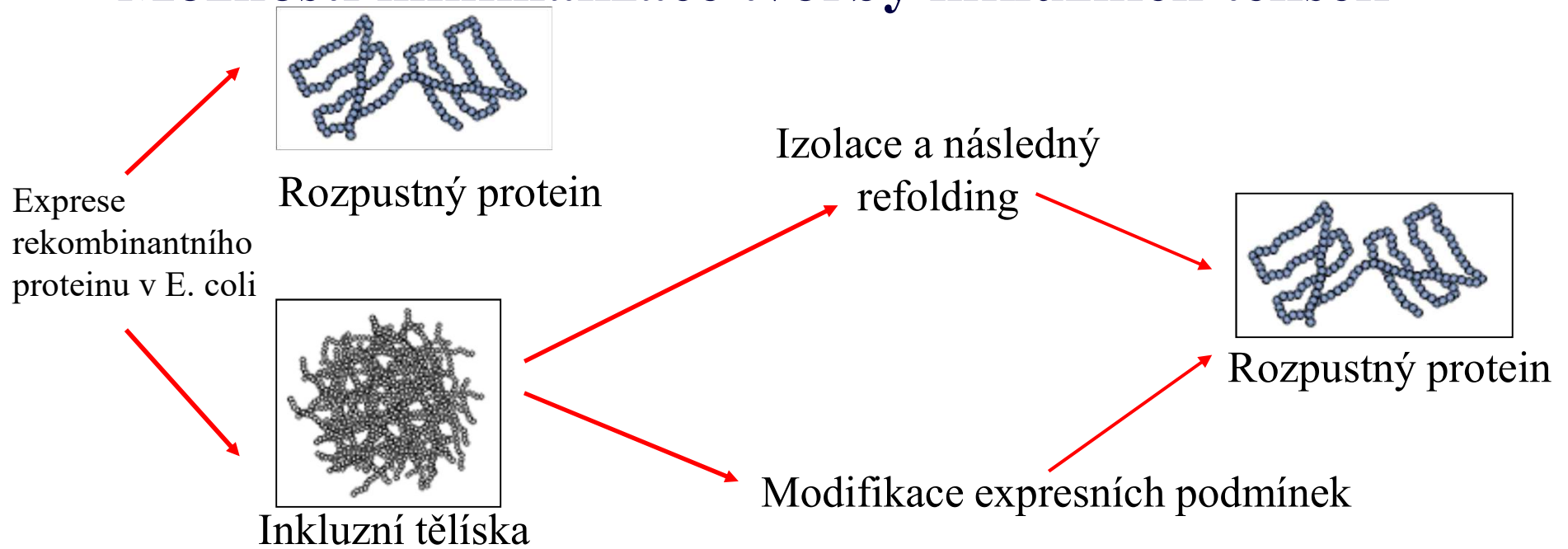
Výhody

- Snadná izolace ve vysoké čistotě a koncentraci
- Ochrana před proteasami
- Pro produkci proteinů, jejichž aktivita je pro buňku letální

Nevýhody

- Proteinová nerozpustnost
- Refolding pro opětné získání biologické aktivity
- Refolding nemusí vést k zaktivování proteinu
- Redukce výtěžku proteinu

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělísek



Možnosti modifikace expresních podmínek:

- Snížení teploty kultivace bakteriální kultury
- Koprodukce chaperonů
- Použití fúzního partnera zlepšujícího rozpustnost (thioredoxin, GST, MBP, NusA,.....)
- Výběr bakteriálního hostitele, např. kmene deficientního na thioredoxin reduktasu
- a další....

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělísek

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



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

•AD494	• Mutace v genu pro thioredoxinreduktasu (trxB)
•Origami	• Mutace v genech pro thioredoxin reduktasu (trxB) and glutathionreduktasu (gor)

Periplazmatická exprese

- Periplazma obsahuje jen 4% všech buněčných proteinů (cca 100 proteinů)
- Transmembránový transport je zprostředkován signálním peptidem na N-konci proteinu
- Prokaryotické signální peptidy úspěšně použité v *E.coli* (ompA, ompT z *E.coli*, protein A z *S. Aureus*, endoglukanasa z *B.subtilis*)

Výhody

- Jednodušší purifikace
- Není zde tak rozsáhlá proteolýza
- Zlepšení tvorby disulfidických můstků/foldingu

Nevýhody

- Signální peptid nezajistí vždy transport do periplazmy
- Mohou se také tvořit inkluzní tělíska

Extracelulární exprese

- Sekrece proteinů do kultivačního média
- Chybí účinná cesta pro transport skrz vnější membránu (*E.coli* sekretuje velmi málo proteinů).
- Některé proteiny sekretované do periplazmy pasivně difundují do média.
- Zatím spíše neúspěšná manipulace s různými transportními cestami, které by usnadňovaly sekreci cizího proteinu.

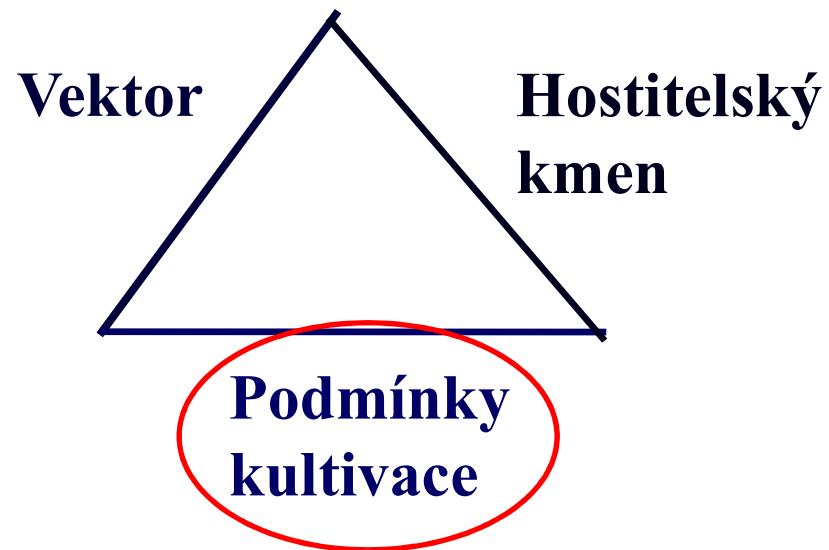
Výhody

- Minimální kontaminace ostatními proteiny (jednodušší purifikace)
- Nejmenší hladina proteolýzy
- Zlepšení foldingu

Nevýhody

- Často velmi nízká sekrece
- Hodně zředěný protein

Modifikace růstových podmínek



Podmínky kultivace

Možnosti modifikace podmínek kultivace bakteriální kultury *E.coli* za účelem zvýšení produkce rozpustného proteinu:

Experimentálně se testuje:

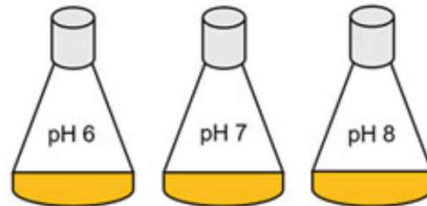
- hodnota hustoty (OD) buněčné kultury
- Složení kultivačního média (pH, přídavek specifických substrátů, kofaktorů, složení živin-bohaté či minimální média)
- teplota růstu bakterií, zejména teplota při indukci exprese
- koncentrace indukčního činidla
- délka indukce exprese

Experimentální postup pro testování exprese

Overnight culture in LB medium, 3 mL



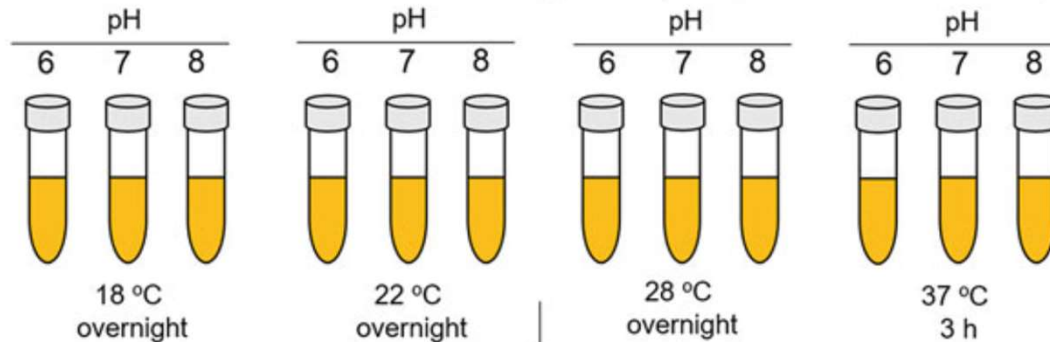
Inoculate 800 μ L into each flask containing 20 mL of TB medium.



Agitate at 37 °C until $OD_{600} = 0.6-0.8$.

Sample 1 mL of non-induced culture from each flask, spin down, remove the supernatant and store the pellet at -20 °C. Induce protein expression with IPTG (20 μ L of 1 M IPTG).

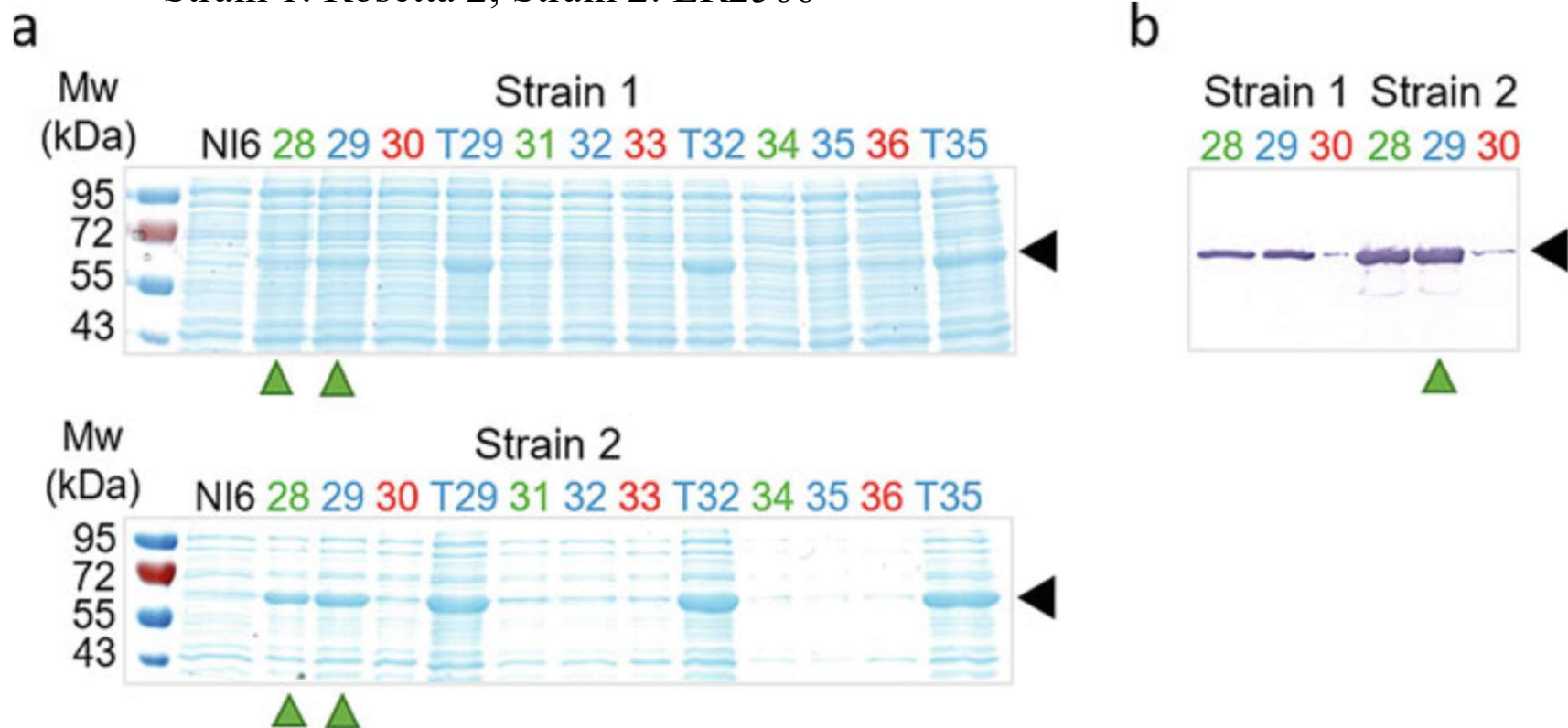
Split the content of each flask into 4 bacterial tubes (4 mL per tube) and grow them at different temperatures/times.



Sample 1 mL from each tube and place separately in TissueLyser adapter according to the scheme in Table 2. Centrifuge at 3220 x g at 4 °C for 2 minutes, remove supernatant with aspirator.

Příklad výsledku testování exprese

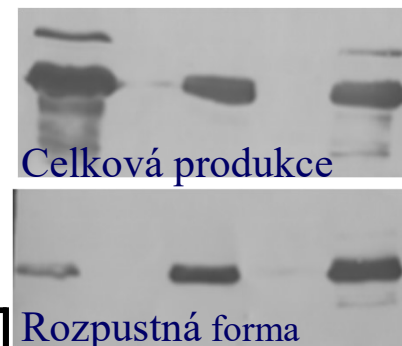
Strain 1: Rosetta 2; Strain 2: ER2566



E. coli ER2566, TB medium pH 6.0, 3 h induction at 37°C, lysis buffer: MES pH 6.0 (**28**) or Tris-HCl pH 7.5 (**29**)

Testování exprese AHP proteinů v *E. coli* -optimalizace teploty kultivace

Médium: LB médium, bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS
Růst ($OD_{600} \sim 0.5-0.6$) *Indukce* 0,4 mM IPTG/3hodiny



Procenta produkce AHP proteinů v rozpustné formě						
<i>t</i> (°C) <i>Růst/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 %

Produkce heterologních proteinů v kvasinkách

VÝHODY :

- snadné genové manipulace
- rychlý růst do vysokých hustot (fermentor), nízká cena
- schopnost posttranslačně modifikovat tvořený produkt
- schopnost extracelulárně sekretovat tvořený produkt
- schopnost tvořit správnou konformaci proteinu
- konečný produkt bez kontaminace endotoxiny

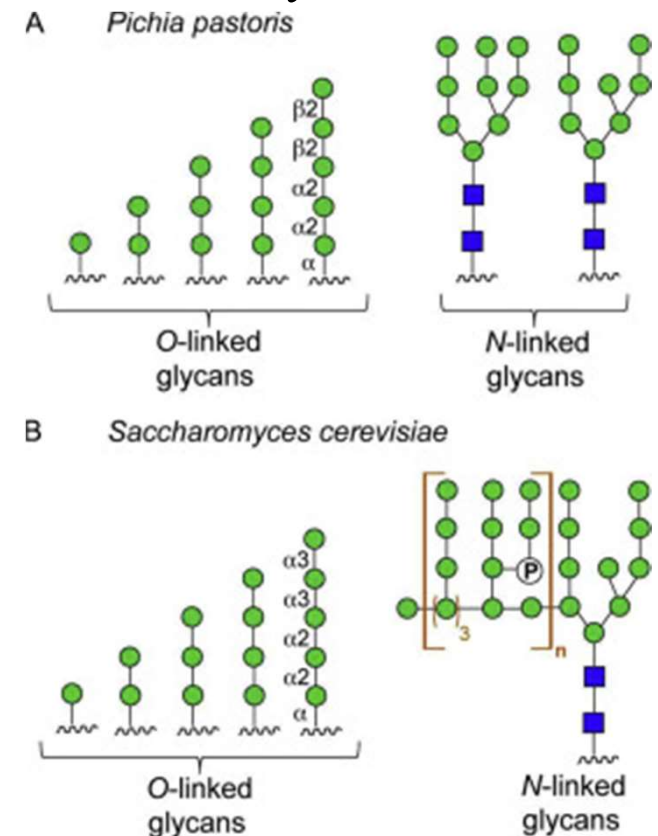
NEVÝHODY:

- používají strukturně odlišný typ N-oligosacharidů než savci
- hyperglykozylace

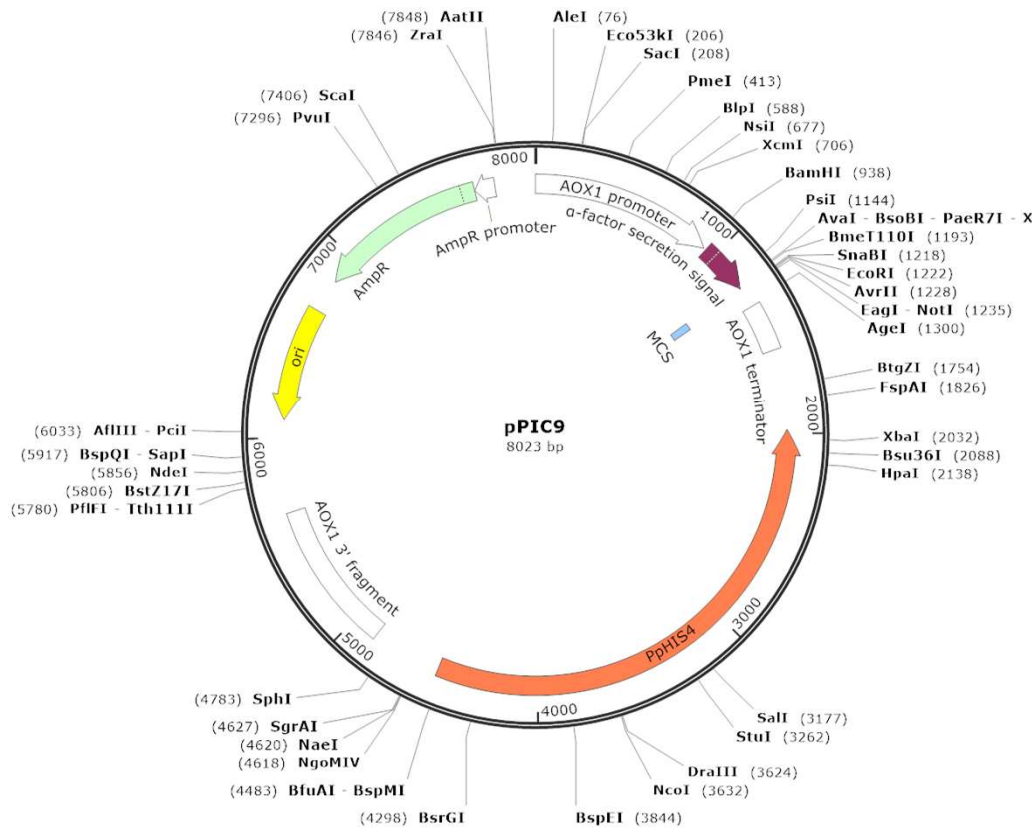
Kvasinkový expresní systém – *Sacharomyces cerevisiae* - *Pichia pastoris*

- *Sacharomyces cerevisiae* -první kvasinkový systém použitý pro produkci rekombinantních proteinů
- *P. pastoris* nejvyužívanější kvasinkový expresní systém
- *P. pastoris* - schopnost kultivace do vysokých hustot (*S. cerevisiae* produkuje velké množství sekundárních metabolitů, které limitují dosáhnouti vysoké buněčné hustoty)

- Od *S. cerevisiae* se liší typem N- glykosylace: glykany u *P. pastoris* obsahují je 8-17 molekul manózy (spojené vazbou α 1,2), zatímco glykany *S. cerevisiae* obsahují 50-150 molekul manózy (tzv. hyperglykozylace, terminální manózy spojené vazbou α 1,3)



Struktura vektoru pro účinnou expresi v *P. pastoris*



Promotory:

Inducibilní

Promotor genu pro alkohol oxidázu 1 (AOX1) - silný a striktně regulovaný

- je plně potlačen při růstu na glukóze či glycerolu a silně indukován při růstu na methanolu jako samotném zdroji uhlíku

-20-30 % celkového intracelulárního proteinu

Konstitutivní

Promotor genu pro glyceraldehyd-3 – fosfát dehydrogenasu (GAP)

- konstitutivně exprimovaný a je nejvíce indukován při růstu na glukose

Selekční markery:

Auxotrofní *HIS4*

Komplementace auxotrofní mutace His

- selekce v kvasinkách

Rezistence vůči antibiotikům

Ampicillin – pro selekci v bakteriích

Sekreční signály

PHO1 (acid phosphatase) z *P. pastoris*

α -mating faktor (α -MF) z *S. cerevisiae*

SUC2 (invertase) z *S. cerevisiae*

- transformace se provádí pomocí integrujících se vektorů (vektory replikující se po integraci do chromozomu)

Expese rekombinantních protein v *Pichia pastoris*

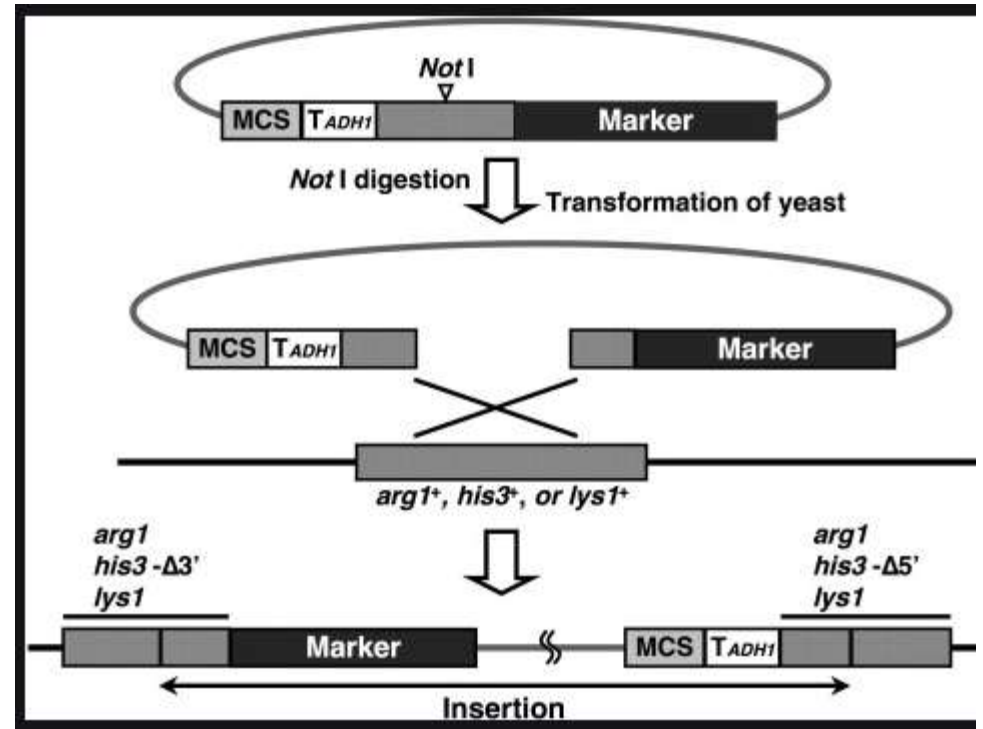
Klonování genu do vektoru, selekce konstruktů v *E.coli*, izolace DNA konstruktů

Linearizace konstruktů

Transformace kompetentních buněk *P. pastoris*

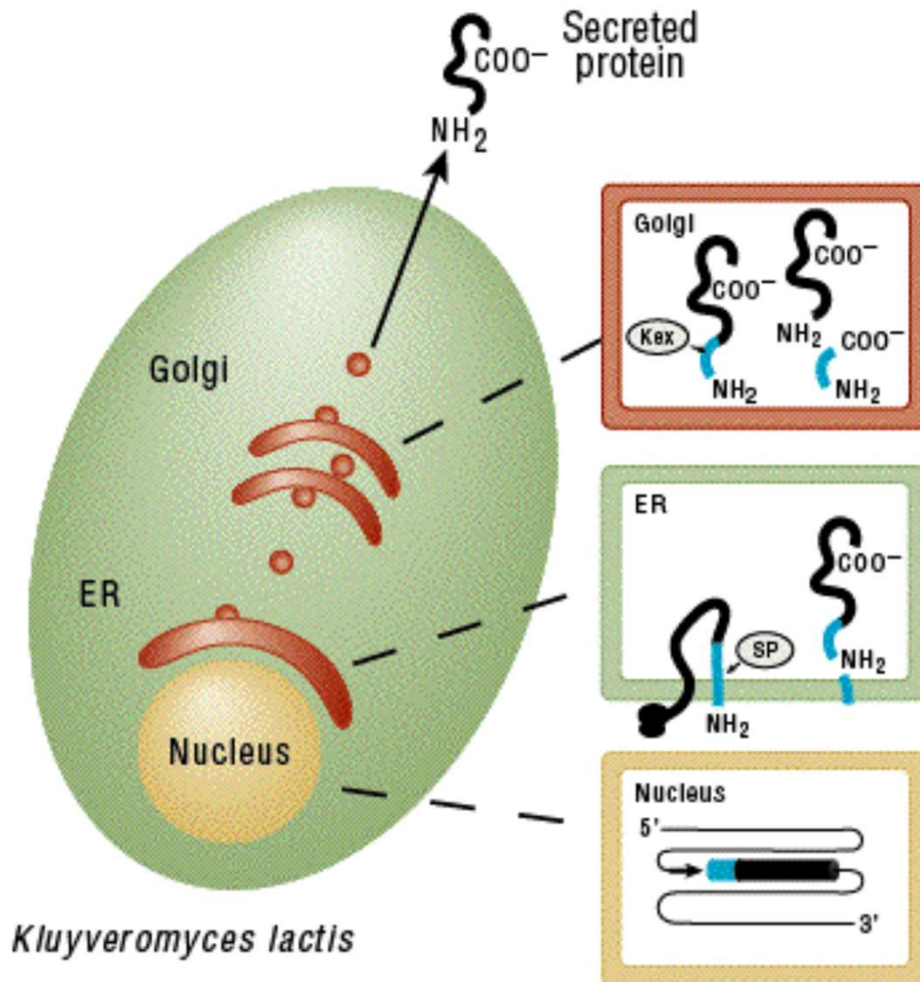
Selekce transformantů

Expese rekombinantního proteinu



Sekrece proteinů u kvasinek

- Intracelulární exprese nebo sekrece



Sekreční dráha je velmi podobná dráze vyšších eukaryot

N-terminální peptid pro kotranslační translokaci sekretovaného proteinu do ER je odštěpen signální peptidázou.

Příklady signálních sekvencí: Pho5, Suc2 a α -mating factor

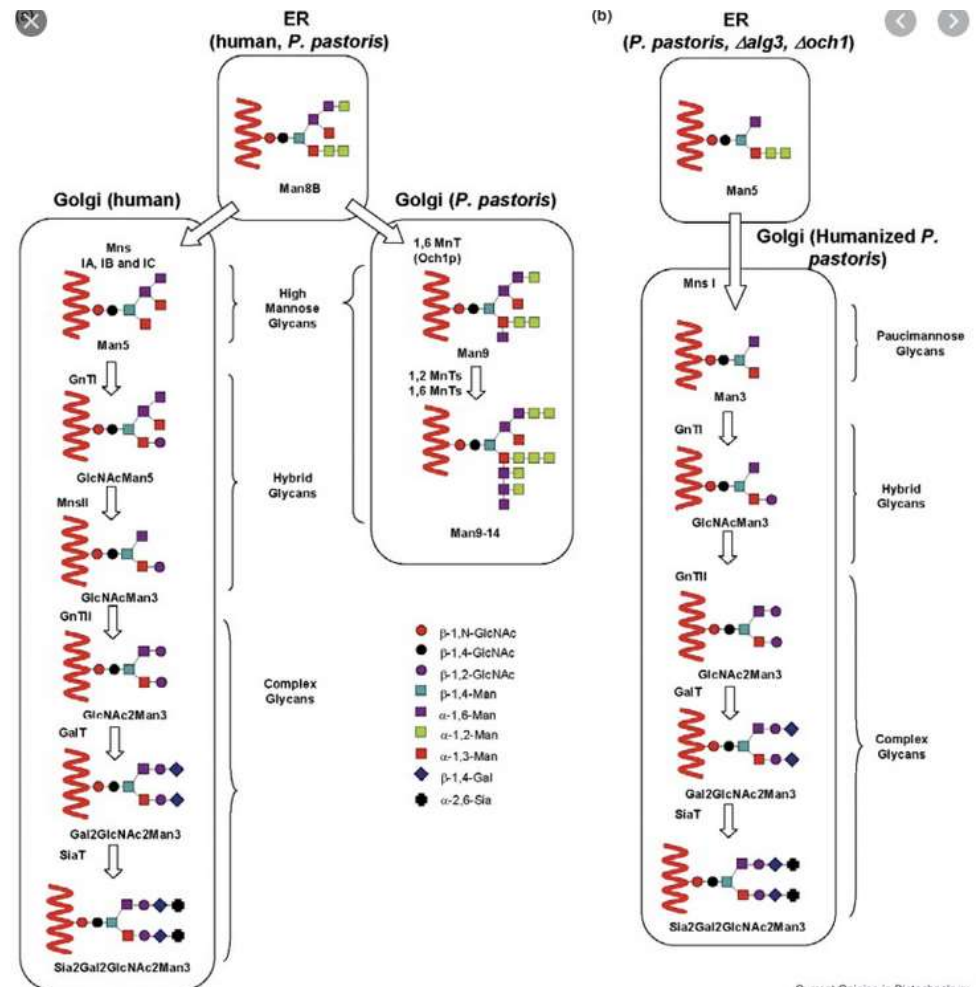
Sekrece pomocí α -mating faktoru

Protein je společně se signálním peptidem – α -MF (α -mating factor) doménou exprimován v jádře.

1. Signální peptid v α -MF doméně navede protein do ER, kde je odštěpen signální peptidázou.
2. Fúzní protein je transportován do Golgiho aparátu, kde Kex proteáza štěpí zbytek α -MF domény a protein je sekretován do média.

Odlišnost glykosylace v *P. pastoris*

- vysoký obsah manózy je imunogenní pro člověka
- pro produkce terapeutických proteinů byly vytvořeny *P. pastoris* (např. kmen SuperMan5 a další) s uniformním lidským způsobem N-glykozylace
- dodatečné enzymy: manosidáza I a II, transferáza galaktózy, N-acetylglukosaminů a kyseliny sialové
- rozšíření použití *P. pastoris* např. pro expresi protilátek



Produkce heterologních proteinů v hmyzích buňkách (Hmyzí buňky s bakulovirovými vektory)

VÝHODY :

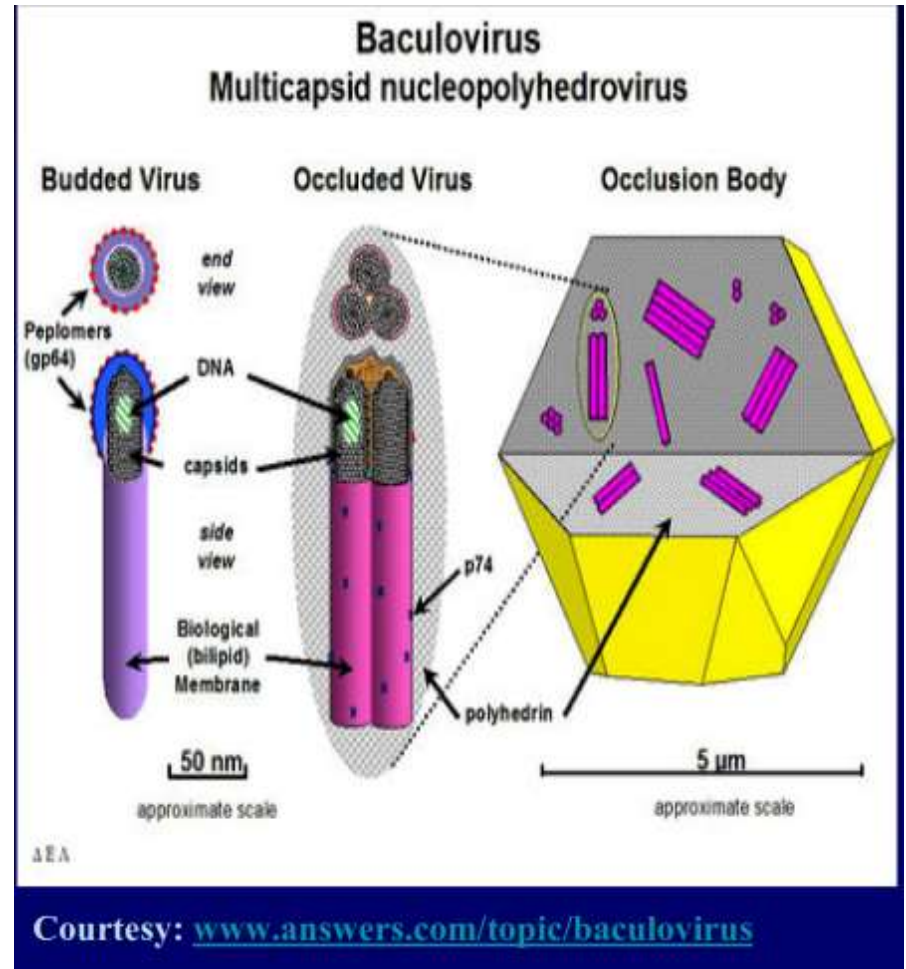
- Zajištění nativní konformace proteinu
- Posttranslační modifikace
- Není kontaminace konečného produktu endotoxiny
- Sekrece proteinu

NEVÝHODY:

- Negativní efekt infekce bakulovirem na viabilitu buněk
- Heterologní geny nejsou produkovány kontinuálně (každá exprese vyžaduje novou infekci buněk bakulovirem)
- Způsob glykozylace odlišný od savčích buněk
- Nižší výtěžnost, časově náročnější, drahé média, těžší na manipulaci (nebezpečí kontaminace)

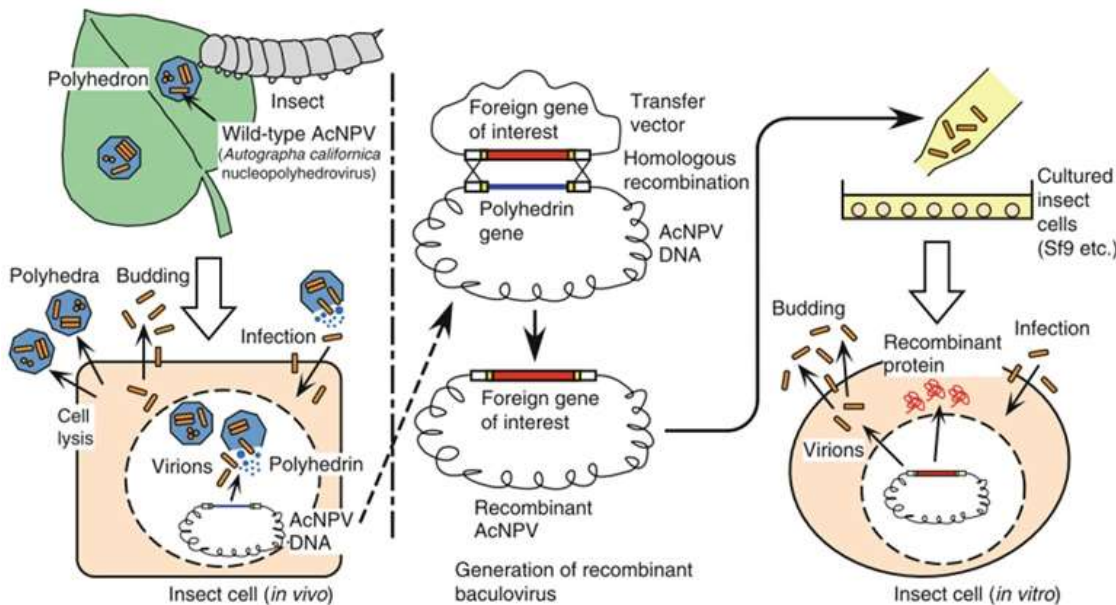
Co je bakulovirus?

- obalený, ds DNA virus s kapsidou tyčinkovitého tvaru
- během životního cyklu existuje ve dvou rozdílných formách “pučící virus“ a opouzdřený virus
- vysoce druhově specifické - infikují jen bezobratlý hmyz
- mezi nejčastější hostitele patří nedospělé larvální formy hmyzu
- k nejvíce prostudovaným a využívaným bakulovirům patří virus AcMNPV (*Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*)



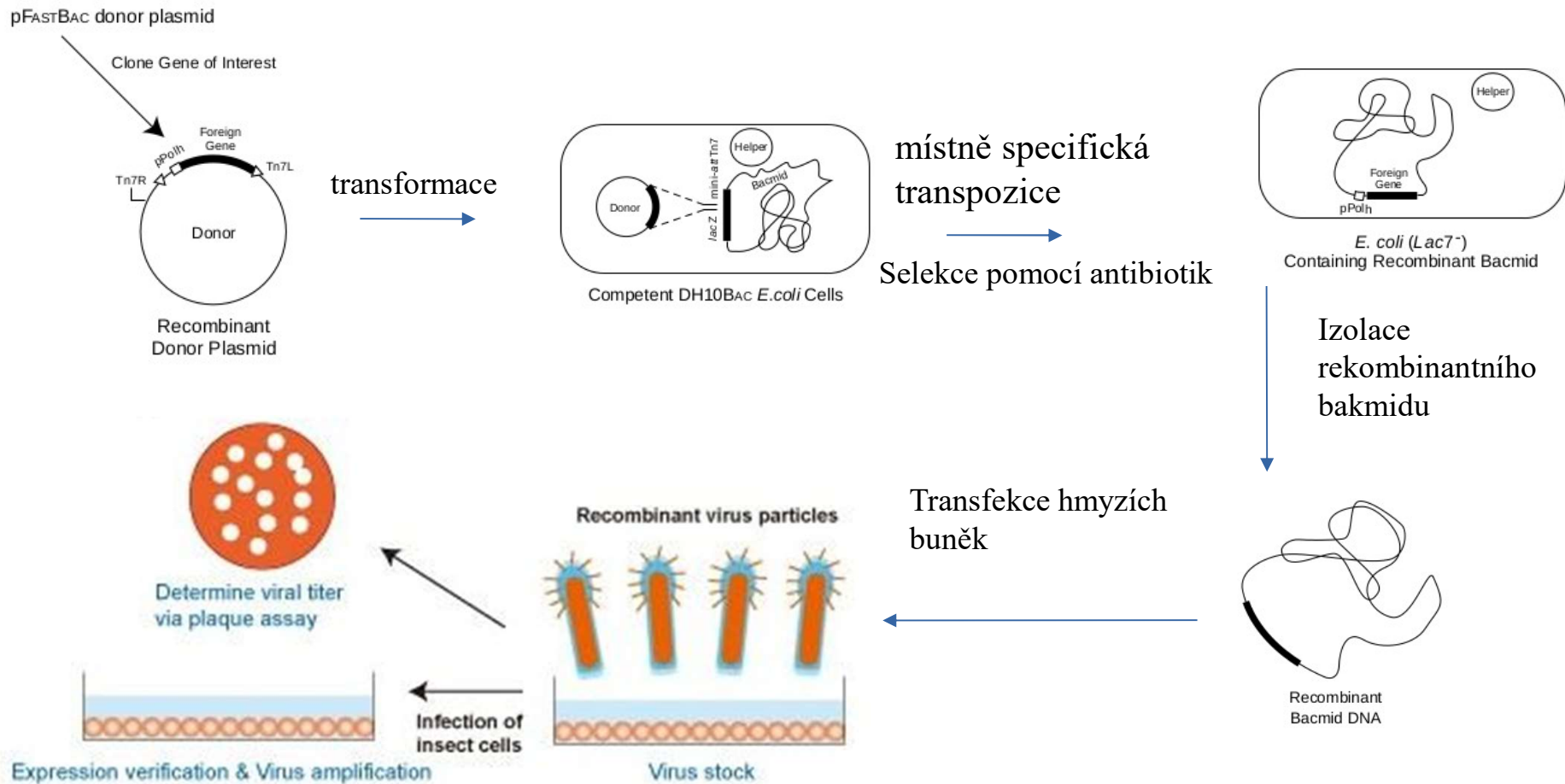
Bakulovirový expresní systém

- založený na infekci kultivovaných hmyzích buněk rekombinantním virem AcMNPV (Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus) nesoucím gen pro tvorbu cílového proteinu.



- hostitelské hmyzí buňky
 - ovariální buňky motýlů druhu *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf-21)
- bakulovirový vektor (tzv. bakmid)
 - velký, kyvadlový vektor (AcMNPV)
 - obsahuje všechny geny nezbytné k produkci virových částic
- velmi silný promotor polyhedrinového genu (polyh)

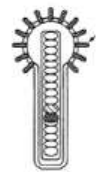
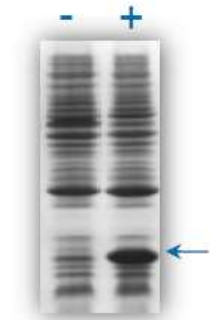
Bac-to-Bac expresní systém : „from Bacterium to Baculovirus“



- Po úspěšné transfekci, rekombinantní virové částice jsou získány z média (virový zásobní stock) a mohou být amplifikovány do vyšších množství, aby mohly být použity pro infekci dostatečného množství buněk.

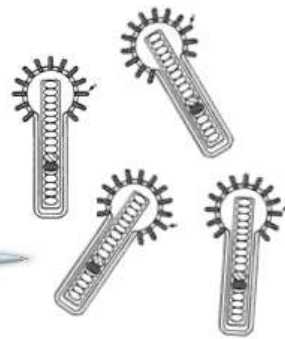
Bac-to-Bac expresní systém: „from Bacterium to Baculovirus“

Expression evaluation



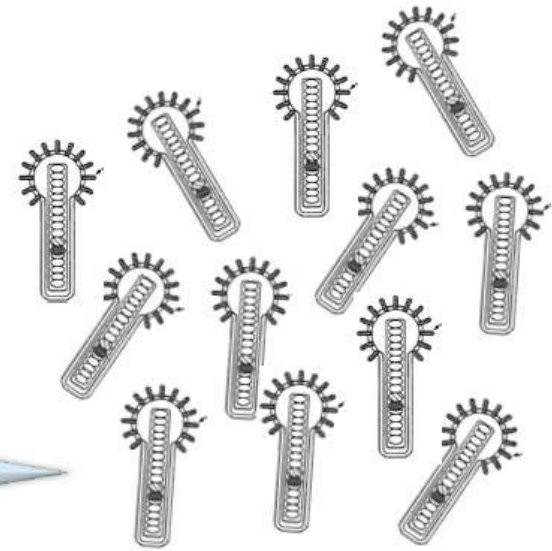
P1

Amplification
sf9 cells



P2

Amplification
sf9 cells






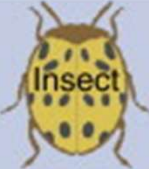
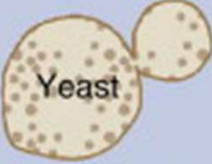
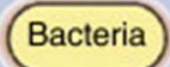




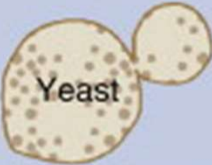
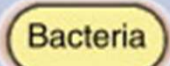
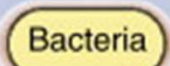
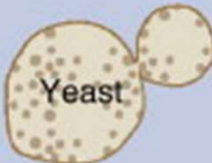




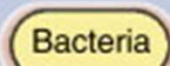
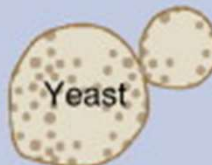




P3

Po dvou generacích je dosaženo titru $10^6 - 10^8$ pfu/ml



WORST

BEST

	Transgenics	Plants	Mammalian	Insect	Yeast	Bacteria
SPEED						
COST						
GLYCO-SYLATION						
FOLDING						
GOVERNMENT REGULATION	