

GENOVÉ TECHNOLOGIE

Genomika a genová exprese

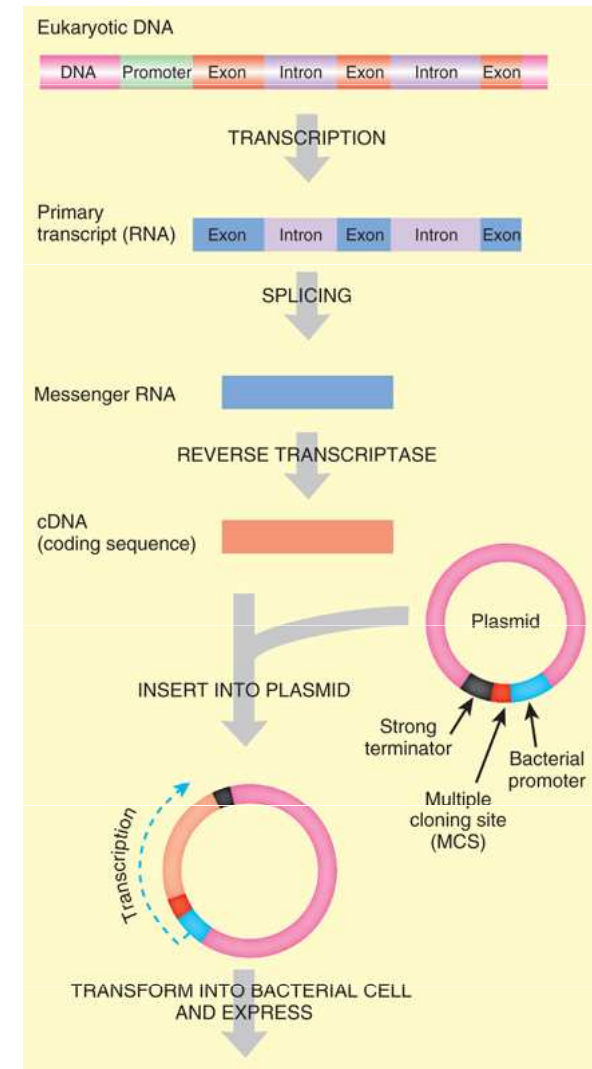
techniky mapování genů, nekódující části genomu, bioinformatické nástroje, farmakogenetika, DNA mikroarrays, RNA-seq techniky, metagenomika, epigenetika

Rekombinantní proteiny

- Proteomika identifikuje relevantních proteiny
- Potřeba jejich detailního studia a charakterizace
- V případě praktického využití potřeba produkce ve velkých objemech
- Přes 100 rekombinantních proteinů je dnes užíváno jako terapeutika
- Vyjma protilátek mohou být rozděleny na:
 - náhradu za chybějící nebo chybné proteiny
 - zvýšení hladiny existujícího proteinu
 - inhibici infekčního agens
 - přenášení jiných molekul
- Exprese genů ve velkokapacitním měřítku přináší celou řadu problémů:
 - nestabilita více-kopiových plazmidů, cena antibiotik

Expese v bakteriích

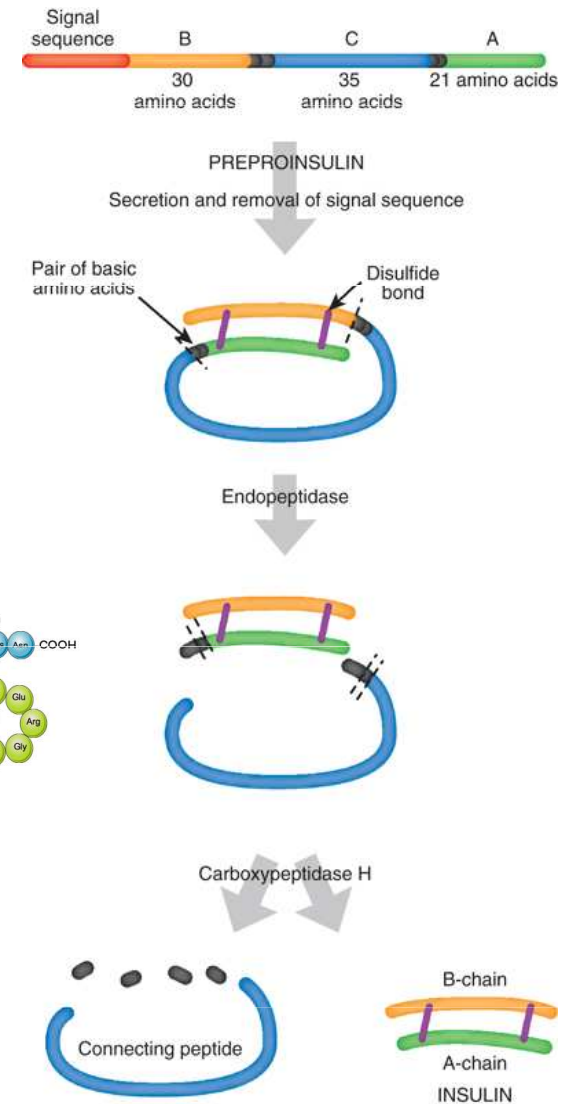
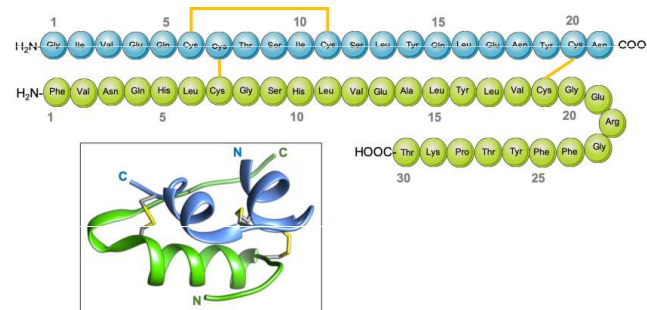
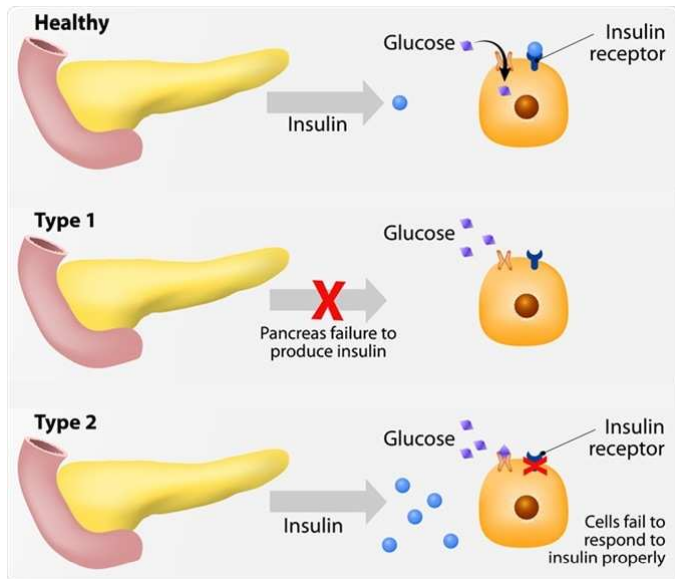
- Pro zvýšení exprese se používají speciální plazmidy = expresní vektory
 - silný promotor, adekvátní ori místo, selekční marker pro antibiotikum
- Expese eukaryontních proteinů je více problematická
- Nutná záměna promotoru, absence sestřihu, nízká míra translace
 - slabá interakce ribozomu s RBS místem, nestabilita mRNA, limitní množství tRNA
- Nutnost použití speciálně upravených vektorů



Clark and Pazdernik, 2016

Inzulín

- První geneticky upravený (E. coli – 1979) komerčně produkováný proteinový hormon (Eli Lilly, 1982, <https://www.youtube.com/watch?v=3uNsBAbpE-8>).
- Preproinsulin – Proinsulin - Insulin

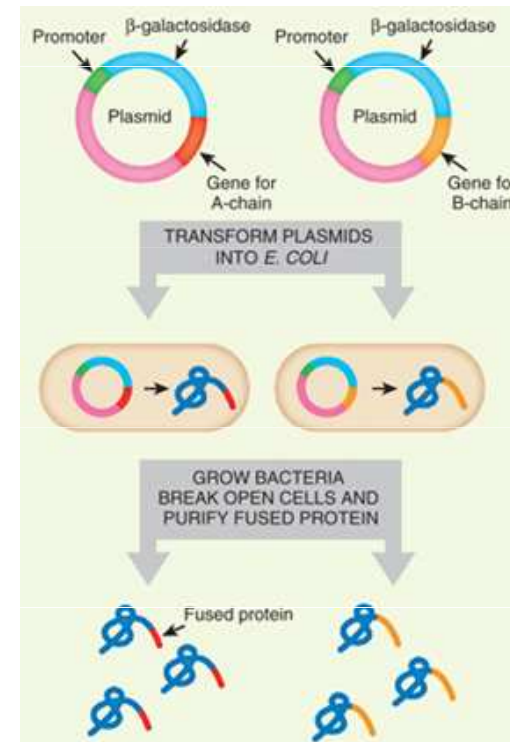
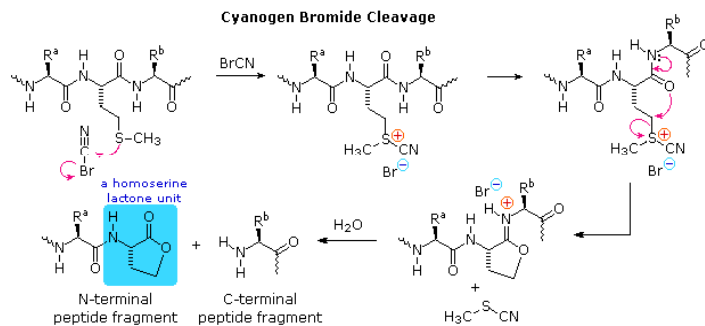


Clark and Pazdernik, 2016

Rekombinantní Inzulín

<https://www.youtube.com/watch?v=5eKdZ0dVCCo&t=606s>
<https://www.youtube.com/watch?v=VKpthcW1IU&t=214s>
<https://www.youtube.com/watch?v=N7vxq948I-U&t=30s>

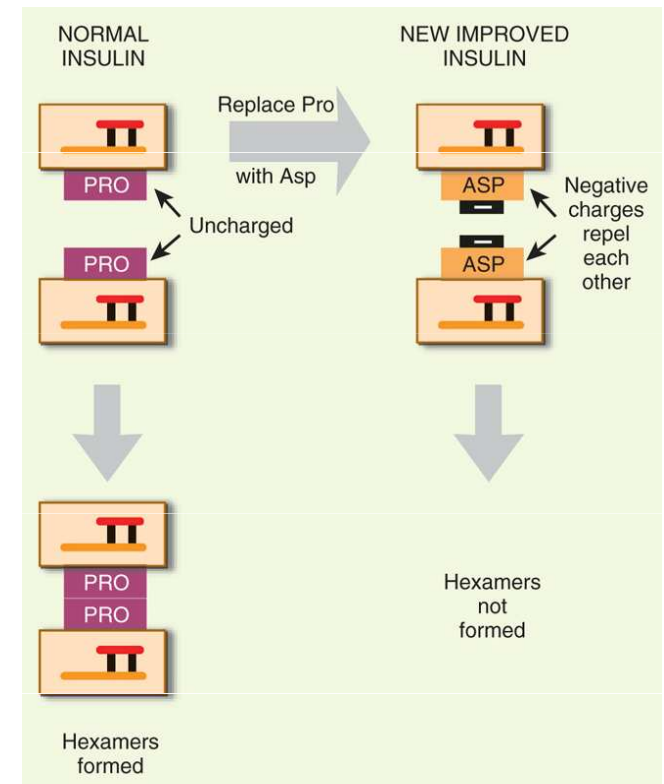
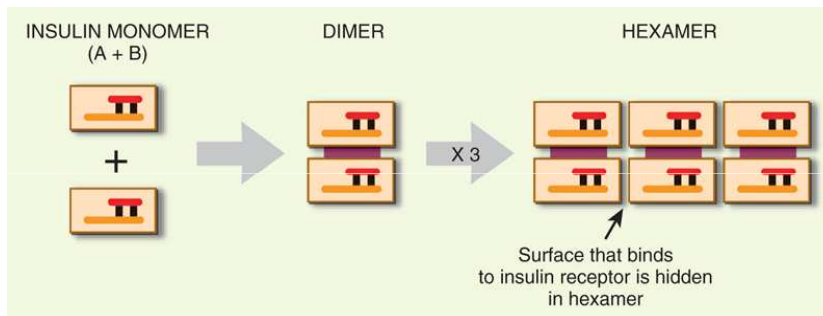
- Epxrese obtížná vzhledem ke komplikovanému zpracování
- E. coli nemůže preproinzulín zpracovat na inzulín
- E. coli netvoří správně S-S vazby v cytoplasmě
 - možnost využití DsbC periplazmatické disulfid oxidoreduktázy
- Nakonec využít postup dvou arteficiálních minigenů



Clark and Pazdernik, 2016

Rekombinantní Inzulín

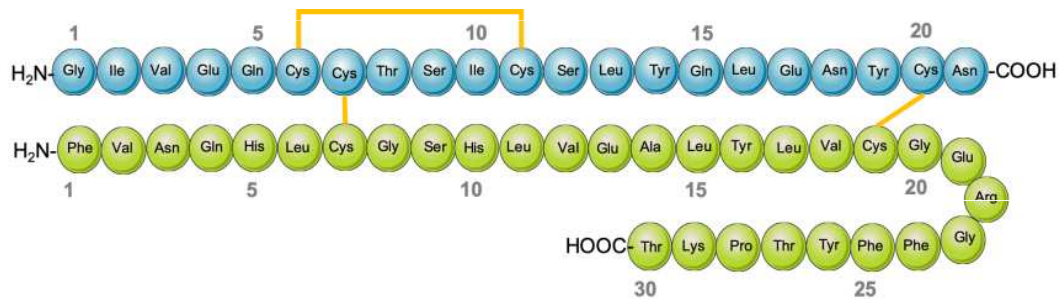
- Inzulín má tendenci tvořit hexamery, které jsou neaktivní
- Problém v rámci injekčního podání – lokálně vysoká koncentrace



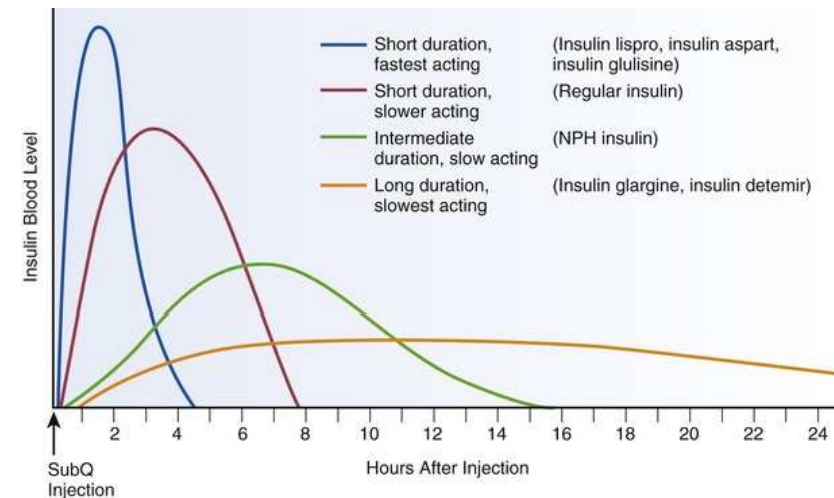
Clark and Pazdernik, 2016

Rekombinantní Inzulín

- Uvedení „rychlého“ inzulínu (NovoLog) společností Novo - přítomnost mutace ProB28Asp
- Později uvedení tzv. „pomalého“ inzulínu (Lantus) společností Sanofi-Aventis - přítomnost mutace AsnA21Gly + 2 x Arg na konci B-řetězce

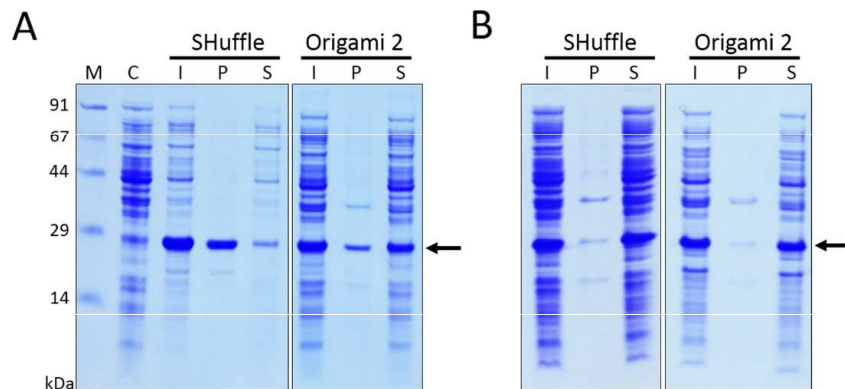


Clark and Pazdernik, 2016

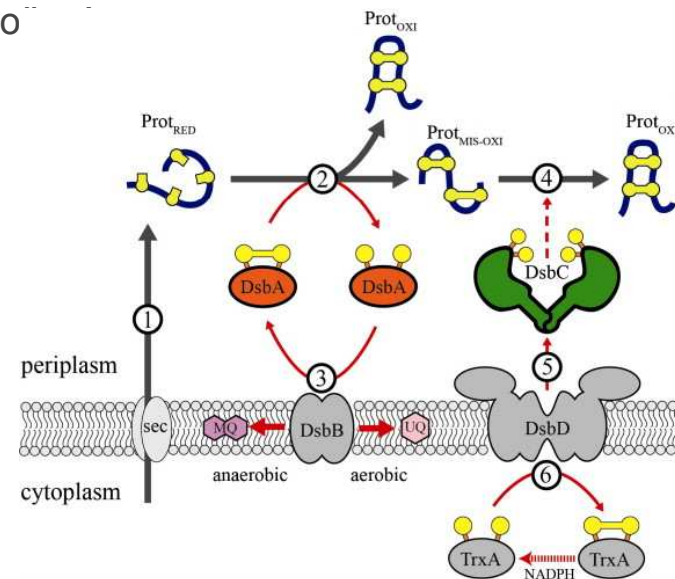


E. Coli Origami™ 2

- Nesou mutaci v gene thioredoxin reduktázy (*trxB*) a glutathion reduktázy (*gor*)
- Zvýšení tvorby disulfidických vazeb v cytoplasmě E. coli
- Vhodné pro proteiny vyžadující tvorbu S-S můstků pro správné slo



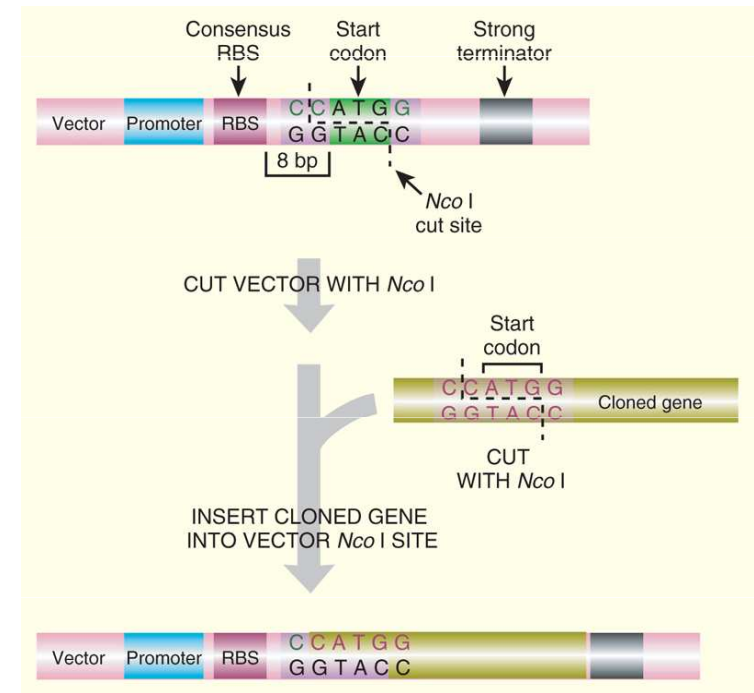
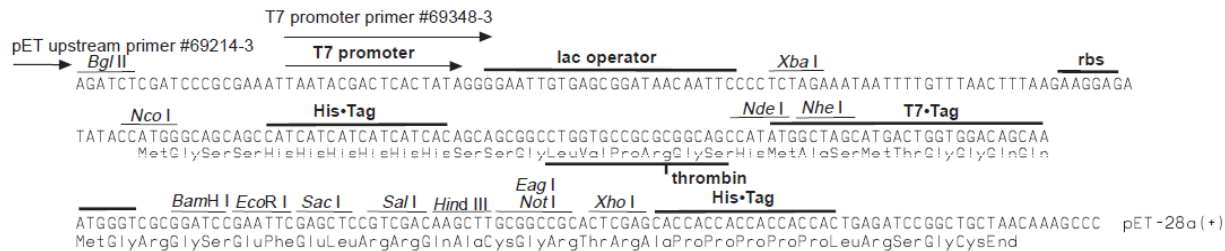
Expresse Oncostatinu M (OSM): A (37°C), B (18°C). C-kontrola bez IPTG, I-lyzát, P-pelet, S-solubilní frakce (Nguyen et al., 2019, SciRep)



Berkmen, 2012

Translační expresní vektory

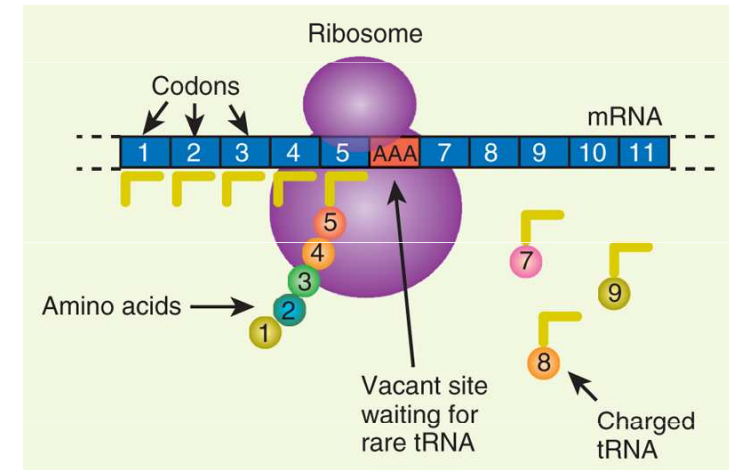
- Vytvořené pro expresi proteinů (pET, pRSET)
 - maximální inicializace translace
 - konsensní RBS místo
 - ATG kodón v optimální vzdálenosti 8 bazí od RBS
 - klonovací místo přímo v ATG kodónu (*Nco* I)
- Možnost dalších komplikací v rámci skládání proteinu



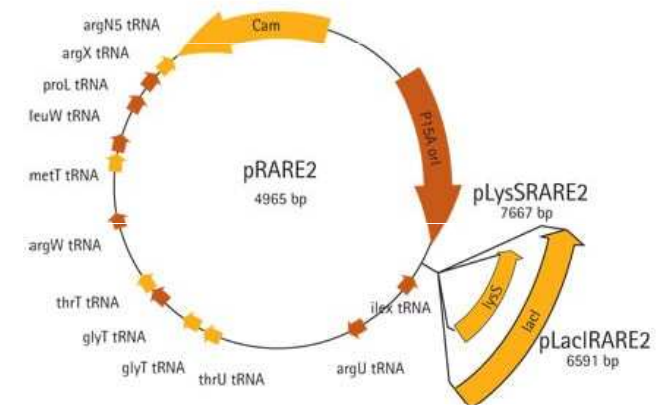
Clark and Pazdernik, 2016

Efekt kodónů

- Exprese proteinů v jiných organismech (eukaryontní v bakteriích)
- Různé organismy upřednostňují jiné kodóny pro danou AK
 - optimalizace použitých kodónů v rámci syntézy genu – až 10ti násobné zvýšení produkce
 - dodání tRNA nesoucí vzácné kodóny do organismu
 - *E. coli* ROSETTA – sedm tRNAs pro vzácné kodóny (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, and CGG)

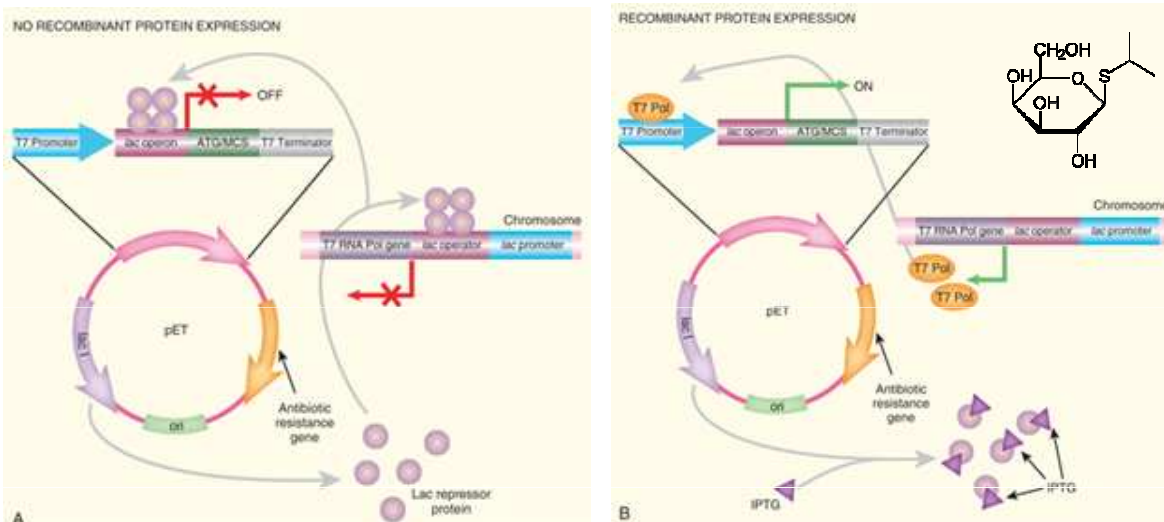


Clark and Pazdernik, 2016

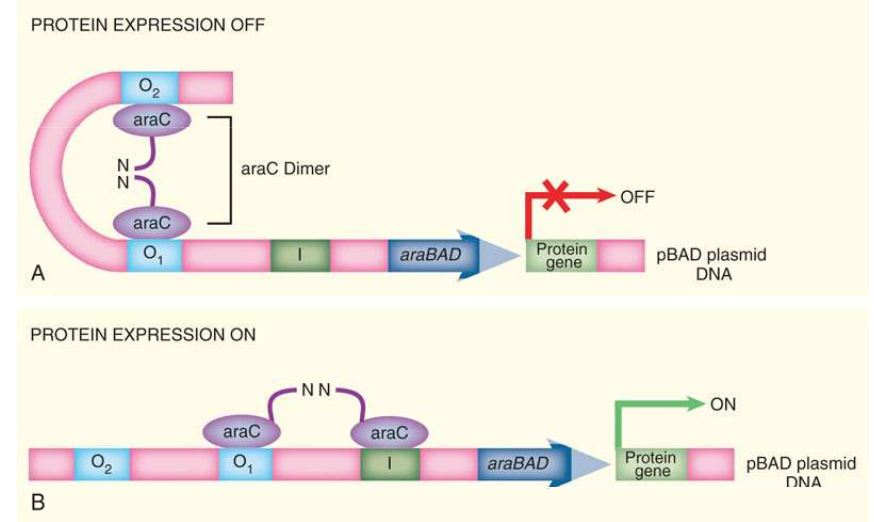


Toxický efekt nadprodukce

Laktózový operon

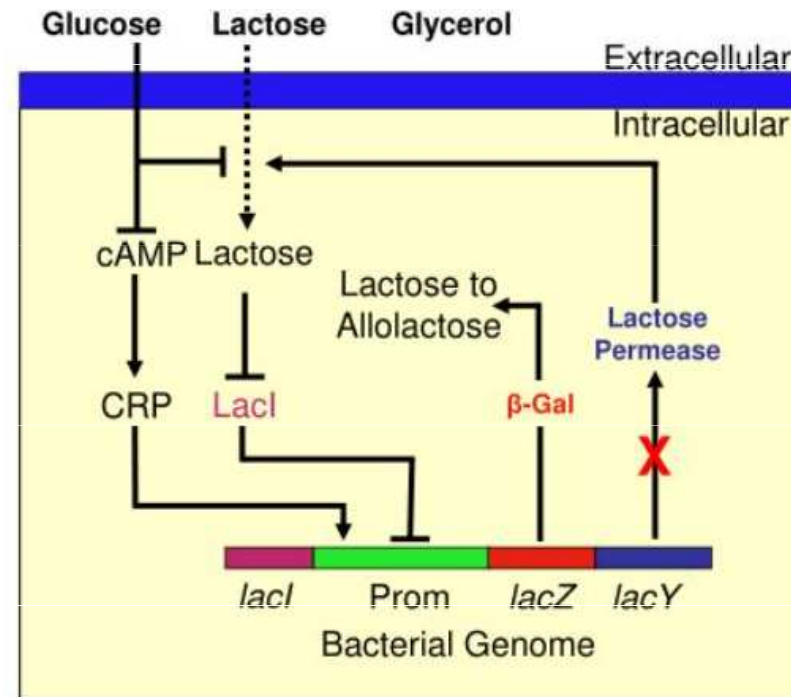
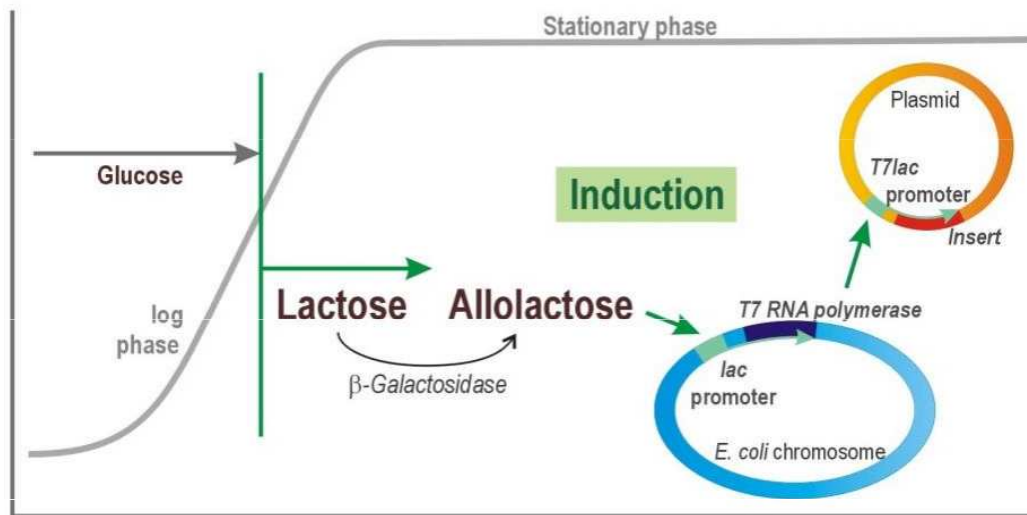


Operon pro arabinózu



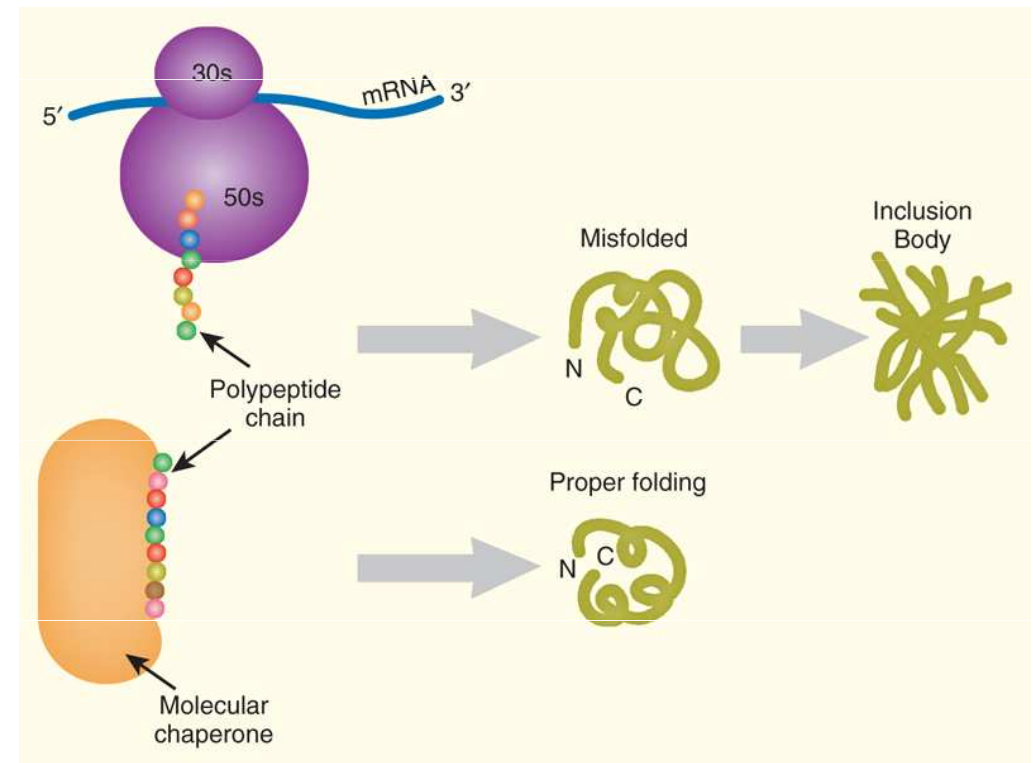
Clark and Pazdernik, 2016

Autoindukční médium



Inkluzní tělíska

- Špatně poskládané proteiny se hromadí v inkluzních těliscích
- Molekulární šaperony – napomáhají správnému sbalení
- Možná sekrece proteinů do periplasmy nebo média
- Proteiny lze solubilizovat z inkluzních tělísek chaotropním činidlem a zpětně poskládat



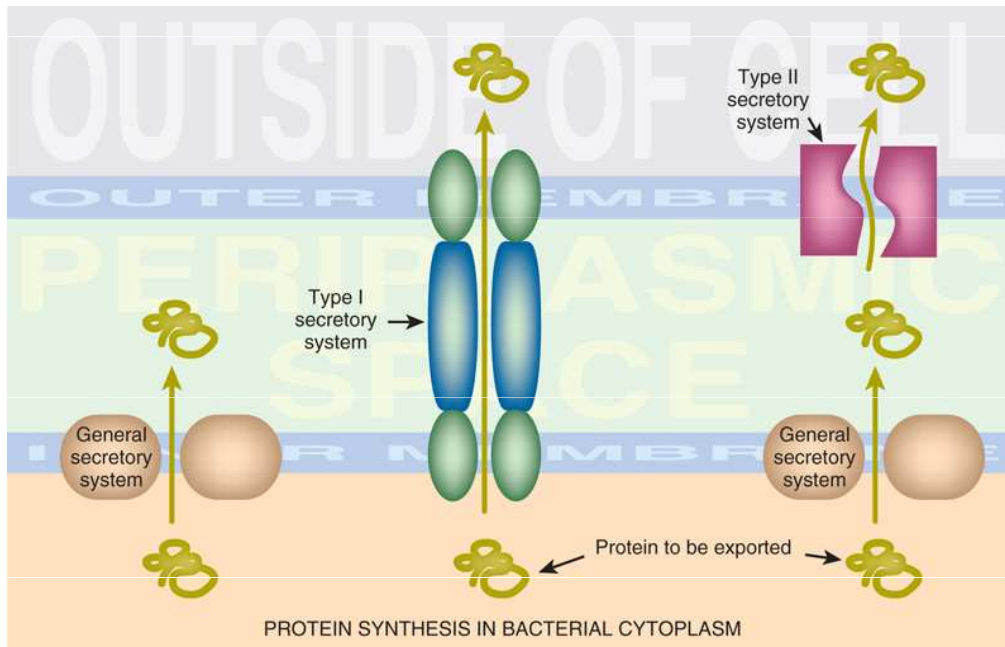
Clark and Pazdernik, 2016

Sekrece proteinů

- Možná exprese do periplasmy nebo média
- Sekrece řízena hydrofobní sekvencí na N-konci štěpenou signální peptidázou
 - možné přidání signální sekvence k proteinu (riziko inkluzních tělísek)
 - možná fúze s přirozeně sekretovaným proteinem (maltóza-vázající protein v *E. coli*)
 - možná sekrece v gram-pozitivní bakterii (*Bacillus*)
 - využití speciálního sekrečního systému Typu I (sekrece hemolyzinu, *E. coli*) nebo Typu II (Endotixin A, *Pseudomonas*)
 - použití autotransportních proteinů

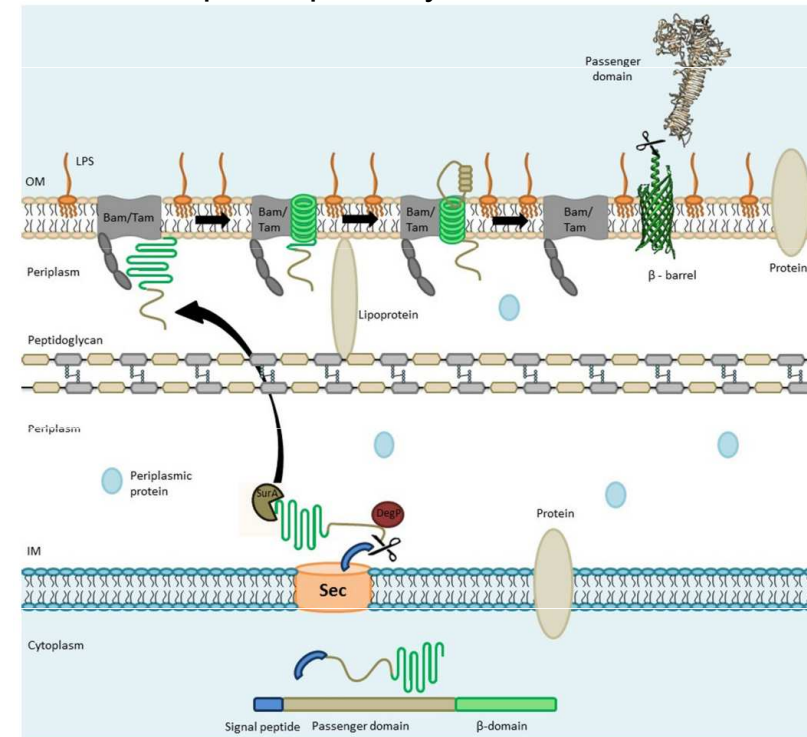
Sekrece proteinů

Sekreční systémy typu I a II



Clark and Pazdernik, 2016

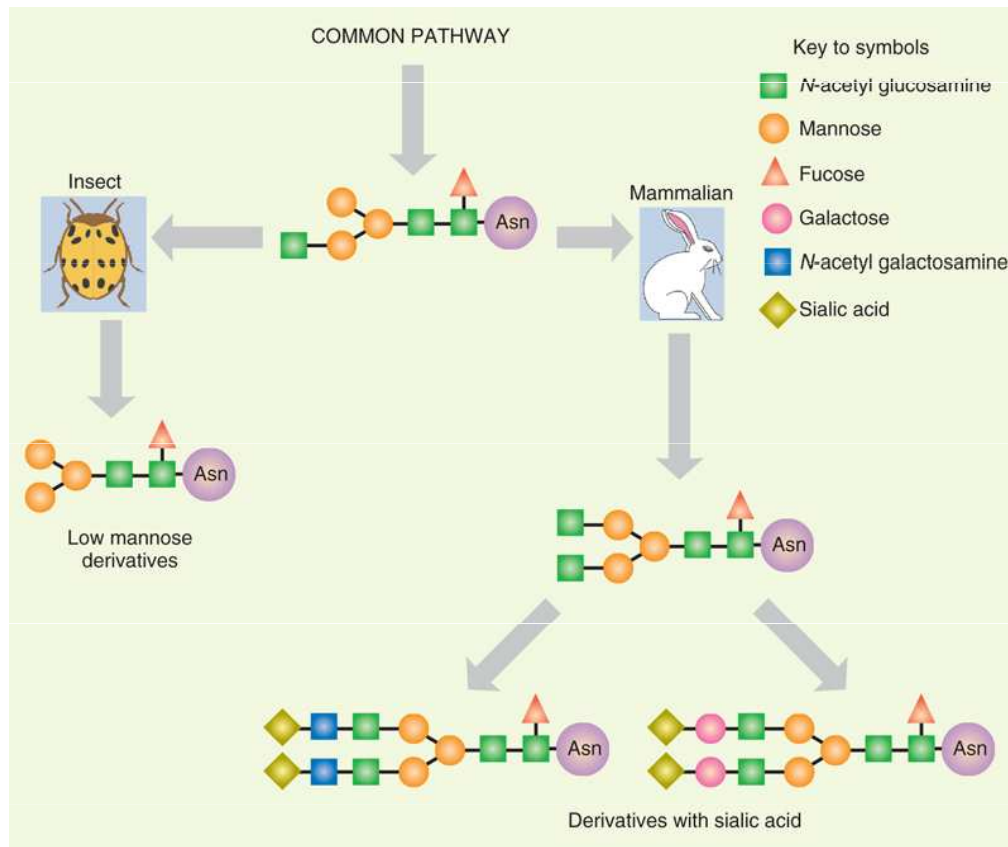
Auto-transportní proteiny



Proteinové glykosylace

- Celá řada proteinů u vyšších organismů je glykosylována
- Glykosylace je nutná pro správnou funkci – např. membránové proteiny
- Bakterie provádí O-glykosylaci (u rodu *Campylobacter* objevena i N-glykosylace)
- Eukaryotní organismy mají většinou N-glykosylace
- Řešením pro expresi glykosylovaných proteinů jsou hmyzí buňky
 - jiný vzor glykosylace oproti savcům
 - řešením jsou upravené hmyzí buňky se savčí glykosylační drahou
- Změna v glykosylačním vzoru může ovlivnit vlastnosti proteinu
 - rekombinantní lidský erythropoetin obsahuje extra N-glykosylační místo (Asn-Xxx-Ser/Thr)
 - nižší afinita k receptoru, avšak delší poločas rozpadu prodlužuje celkově klinickou aktivitu

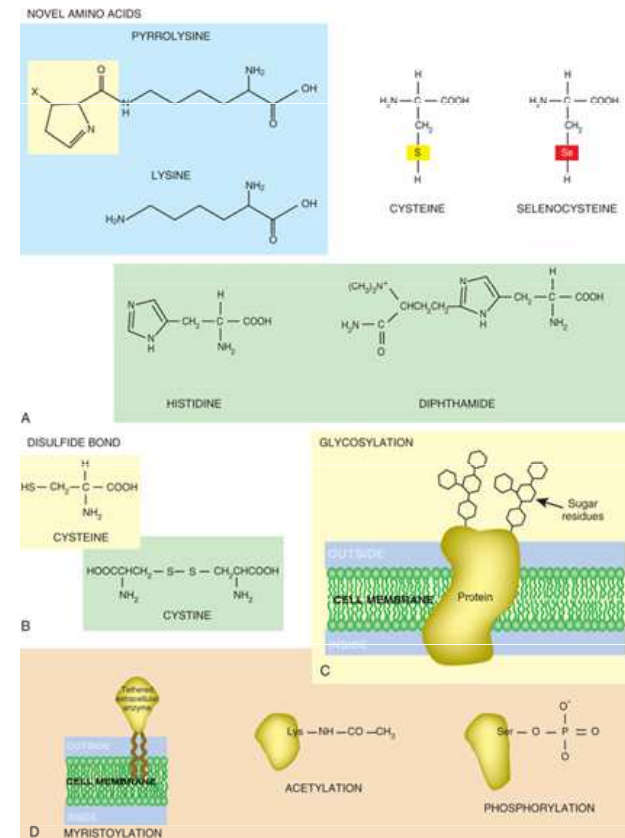
Proteinové glykosylace



Clark and Pazdernik, 2016

Expese proteinů v eukaryotických buňkách

- Celou řadu eukaryotických proteinů je efektivněji exprimovat v eukaryotických buňkách
- Možnost post-translationálních modifikací:
 - chemické modifikace tvořící nové aminokyseliny
 - tvorba disulfidických můstků
 - glykosylace
 - přidání funkčních skupin (mastné kyseliny, acetylace, fosforylace, metylace, sulfurylace)
 - odštěpení pre-kurzorových proteinů potřebných pro sekreci, složení a/nebo aktivaci

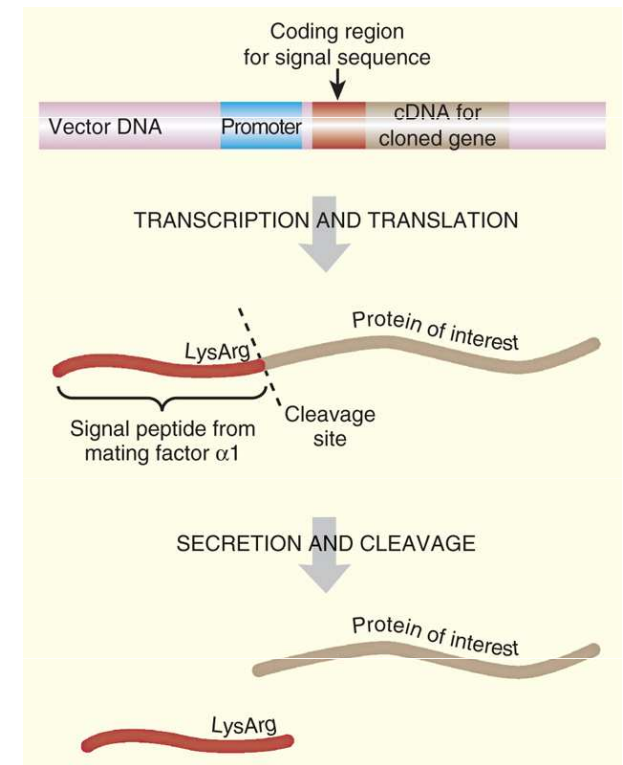


Clark and Pazdernik, 2016

MUNI
SCI

Kvasinky

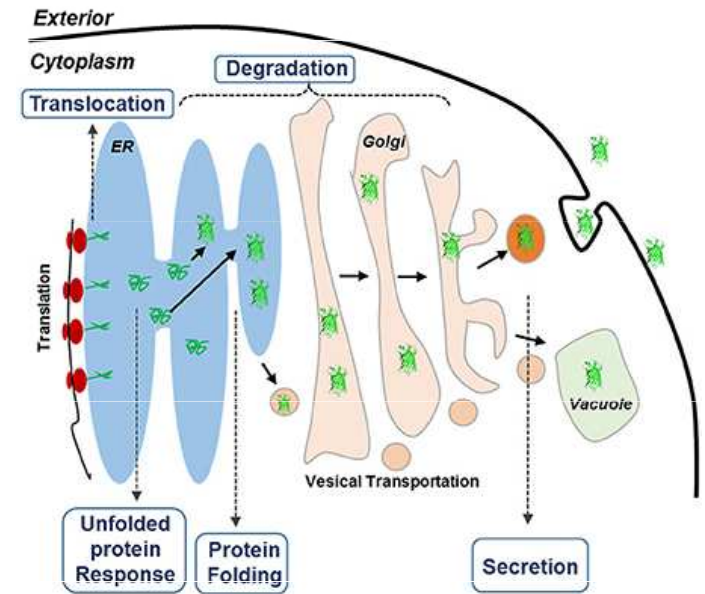
- Pro biotechnologii celá řada výhod:
 - snadná kultivace v malém i velkém měřítku
 - kvasinka *S. cerevisiae* považována za bezpečný organismus
 - kvasinky sekretují velmi málo vlastních proteinů – výhoda při sekreci exprimovaného proteinu
 - DNA může být snadno transformována (chemicky, enzymaticky, elektroporací)
 - charakterizace celé řady promotorů pro cílenou expresi
 - umí celou řadu post-translačních modifikací charakteristických pro eukaryontní organismy
 - glykosylace probíhá pouze u sekretovaných proteinů
- Častá sekrece rekombinantních proteinů pomocí signální sekvence genu pro pářicí faktor α
- Signální peptidáza rozpoznává sekvenci Lys-Arg



Clark and Pazdernik, 2016

Kvasinky

- V současné době exprimovány v kvasince *S. cerevisiae* a *P. pastoris*:
 - insulin
 - srážecí faktor VIIIa
 - různé růstové faktory
 - virové proteiny pro výrobu vakcín nebo diagnostiky (HIV, HBV, HCV)
- Nejčastější problémy exprese v kvasinkách:
 - ztráta expresních plazmidů v rámci velkoobjemových kultivací
 - sekretované proteiny zůstávají mezi PM a buněčnou stěnou
 - dochází k hyper-glykosylaci sekretovaných proteinů (řešení upravou kmenů)



Sheng et al. 2017