

## Molekulární biotechnologie č.6b

- Zvýšení produkce rekombinantního proteinu.

## Další postupy vedoucí ke zvýšení produkce rekombinantního proteinu

- Jsou zaměřeny na stabilitu proteinu

## Cizorodé proteiny

- Se v heterologních buňkách vyskytují v malých množstvích
- Bývají degradovány proteázami

## Degradaci proteinu lze zabránit

- Kovalentním připojením cizorodého proteinu k stabilnímu hostitelskému proteinu
- Touto kombinací – nazývanou fúzní protein – se ochrání klonovaný genový produkt před proteázami hostitelských buněk
- Klonované proteiny jsou odolné vůči degradaci proteolytickými enzymy, jsou-li součástí fúzního proteinu, zatímco samostatné proteiny jsou citlivé na proteolýzu

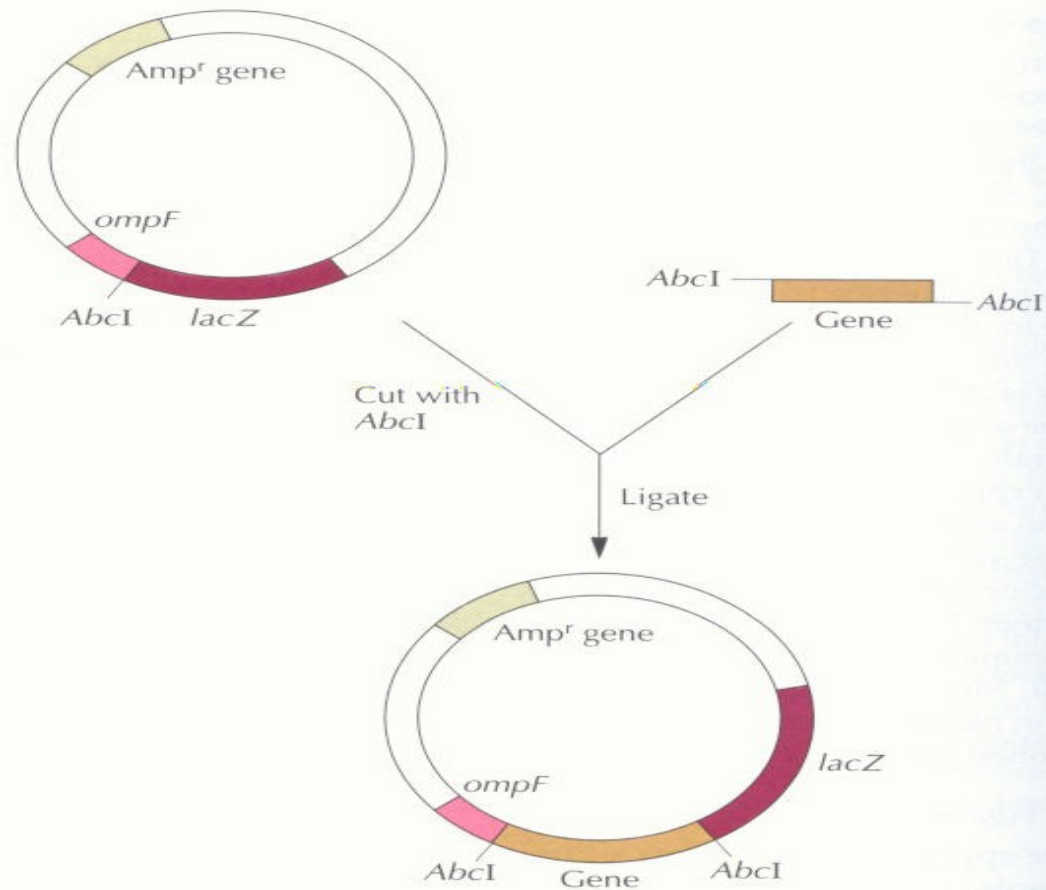
## Fúzní protein - definice

- Fúzní protein: hybridní produkt vznikající expresí sekvence vytvořené fúzí 2 genů technikami rekombinantní DNA

## Fúzní proteiny

- Jsou konstruovány na úrovni DNA
- Ligací kódujících oblastí 2 genů
- Využívají se k tomu fúzní vektory

# Schema klonovacího vektoru pro fuzní protein (Glick 2003)



**Figure 6.9** Fusion protein cloning vector. The plasmid contains an ampicillin resistance (*Amp<sup>r</sup>*) gene as the selectable marker, a DNA sequence encoding the N-terminal segment of the *E. coli* outer membrane protein (*ompF*), a restriction endonuclease site (*AbcI*) for cloning, and a truncated  $\beta$ -galactosidase gene (*lacZ*). The cloned gene (*Gene*) is inserted into the *AbcI* site. After transcription and translation, a tribrid protein is produced.

## Fúzní protein jako finální produkt

- Může být vhodný pro další aplikace (např. v diagnostice)
- Nemusí být vhodný (např. pro klinické použití)

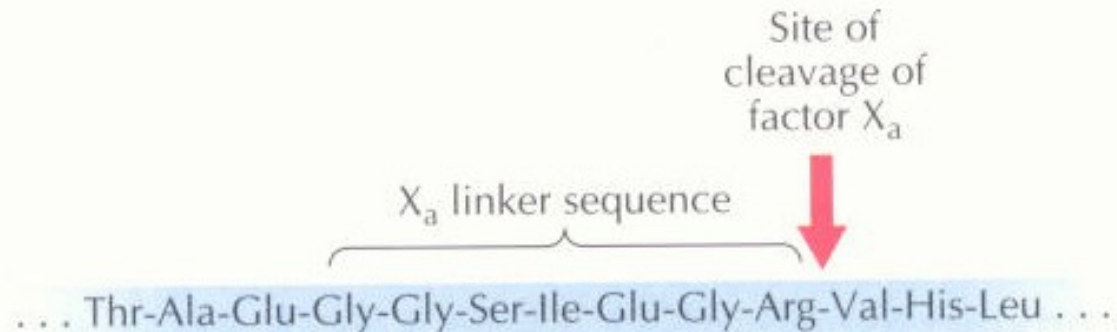


## Odštěpení cílového proteinu od fúzního partnera

- Lze docílit specifickými proteázami
- Cílové místo rozpoznávané proteázami (např. aminokyseliny Ile-Glu-Gly-Arg rozpoznávané faktorem Xa) se připojuje k proteinu na úrovni DNA (tzv. linker) a tvoří součást fúzního vektoru
- Cílové místo rozpoznávané faktorem Xa se v nativních proteinech vyskytuje vzácně a proto se s úspěchem používá ke štěpení fúzních proteinů.
- Obr.

# Proteolytické štěpení fúzního proteinu faktorem X<sub>a</sub> (Glick 2003)

*Figure 6.8* Proteolytic cleavage of a fusion protein by blood coagulation factor X<sub>a</sub>. The factor X<sub>a</sub> recognition sequence (X<sub>a</sub> linker sequence) lies between the amino acid sequences of two different proteins. A functional cloned gene protein (with Val at its N terminus) is released after cleavage.



## Fúsní klonovací vektor pET 102

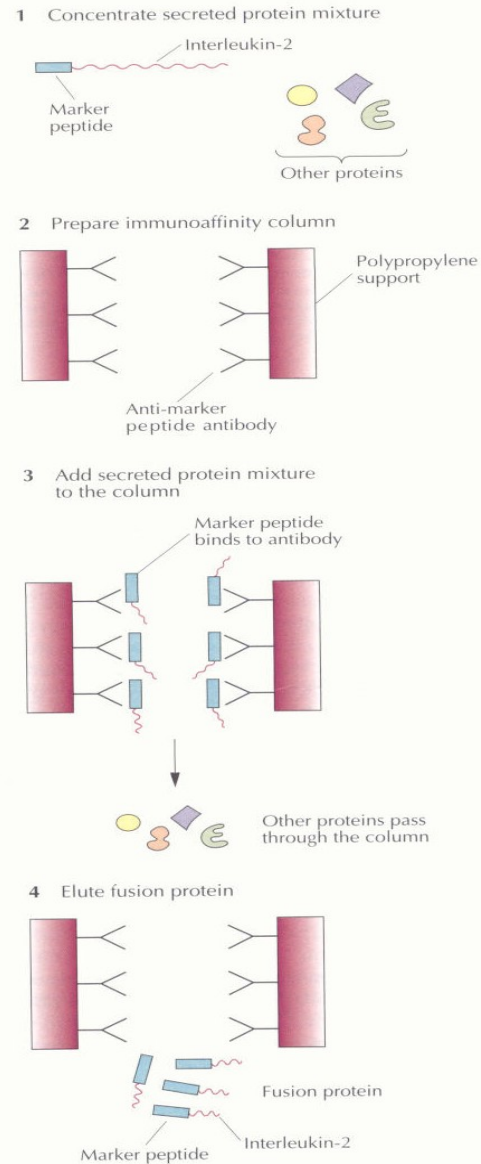
- Obsahuje štěpné místo pro jinou proteinázu – enterokinázu – která umožňuje odštěpit fúzního partnera

## Fúzní proteiny mohou být použity

- Pro purifikaci proteinů
- Např. s využitím imunoafinitní purifikace
- Fúzní partner se nazývá markerový peptid

# Imunoafinitní purifikace proteinu (Glick 2003)

*Figure 6.11* Immunoaffinity chromatographic purification of a fusion protein. An antibody that binds to the marker peptide of the fusion protein (anti-marker peptide antibody) is attached to a solid polypropylene support. The secreted proteins are passed through the column containing the bound antibody. The marker peptide portion of the fusion protein is bound to the antibody, and the other proteins pass through. The immunopurified fusion protein can then be selectively eluted from the column by the addition of pure marker peptide.



# Příklad fuzních partnerů usnadňujících purifikaci cizích proteinů (Glick 2003)

Table 6.3 Some fusion systems used to facilitate the purification of foreign proteins produced in *E. coli*

Fusion partner	Size	Ligand	Elution condition
ZZ	14 kDa	IgG	Low pH
His tail	6–10 aa	Ni <sup>2+</sup>	Imidazole
Strep-tag	10 aa	Streptavidin	Iminobiotin
PinPoint	13 kDa	Streptavidin	Biotin
MBP	40 kDa	Amylose	Maltose
β-Lactamase	27 kDa	Phenyl-boronate	Borate
GST	25 kDa	Glutathione	Reducing agent
Flag	8 aa	Specific MAb	Low calcium

Adapted from Nygren et al., *Trends Biotechnol.* 12:184–188, 1994.

Abbreviations: aa, amino acids; kDa, kilodaltons; ZZ, a fragment of *Staphylococcus aureus* protein A; His, histidine; Strep-tag, a peptide with affinity for streptavidin; PinPoint, a protein fragment which is biotinylated in vivo in *E. coli*; MBP, maltose binding protein; GST, glutathione S-transferase; Flag, a peptide recognized by enterokinase; MAb, monoclonal antibody.

- 25.10.2011

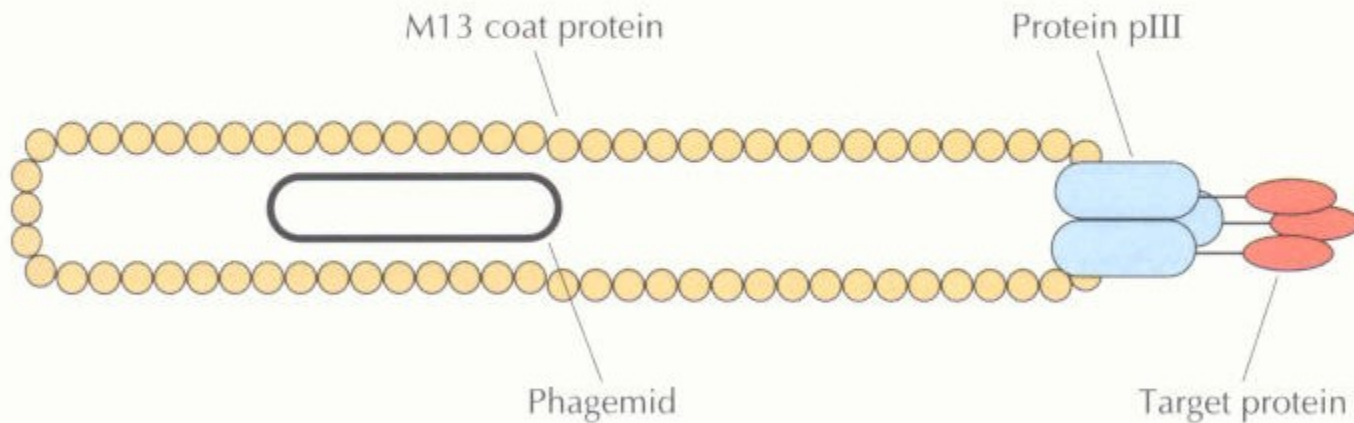
## Speciální fúzní proteinové systémy

- Byly vyvinuty pro skríníng cDNA knihoven, které obsahují velký počet klonů
- Umožňují vyhledávat vzácně exprimované, ale důležité proteiny kódované cDNA
- Molekuly cDNA jsou klonovány do genů kódujících povrchový antigen fága M13 (gen kódující protein III) nebo do genů kódujících pili bakteriálních buněk
- Po transkripci a translaci je fúzní protein inkorporován do povrchových struktur fága nebo bakterie, kde je detekován imunologicky
- Obr. Rekombinantní fág M13



# Rekombinantní fág M13 s fúzním proteinem (Glick 2003)

*Figure 6.12* Recombinant bacteriophage M13 displaying a fusion protein consisting of the target protein and phage protein pIII.



## Zvýšení proteinové stability

- Lze docílit i přítomností vhodné AK na N terminálním konci proteinu
- Viz enzym beta-galaktosidáza a jeho stabilita v závislosti na aminokyselinách na N terminálním konci

# Určitá aminokyselina na N konci zvyšuje životnost proteinů (Glick 2003)

*Table 6.4* Stability of  $\beta$ -galactosidase with certain amino acids added to its N terminus

Amino acid added	Half-life
Met, Ser, Ala	>20 h
Thr, Val, Gly	>20 h
Ile, Glu	>30 min
Tyr, Gln	~10 min
Pro	~7 min
Phe, Leu, Asp, Lys	~3 min
Arg	~2 min

Adapted from Bachmair et al., *Science* 234:179–186, 1986.

## Vhodné aminokyseliny

- Mohou být snadno inkorporovány do klonovaného proteinu tak, že se jejich sekvence přidá ke klonovanému genu

## Proteiny s dlouhou životností

- Se akumulují v buňkách a tím se zvyšuje výtěžek produktu
- Platí to jak u prokaryontních tak u eukaryontních proteinů

## Stabilitu proteinů lze zvyšovat změnou oblastí PEST

- Jsou oblasti proteinu bohaté na prolin (P), glutamovou kyselinu (E), serin (S) a threonin (T)
- Určené často uvnitř buňky k degradaci
- Dají se změnit technikami genových manipulací (cílená mutageneze) a tak zvýšit stabilitu proteinu
- Změny AK nesmí ovlivnit funkci proteinu