

Molekulární biotechnologie č.7

Zvyšování produkce proteinu

- Ovlivnění účinnosti translace.
- Integrační vektory.
- Ovlivnění místa sekrece.

Ovlivňování účinnosti translace

- Množství klonovaného proteinu závisí rovněž na účinnosti translace

U prokaryontních buněk

- Nedochozí k translaci z různých mRNA se stejnou účinností
- Hladiny v syntéze proteinů jsou až stonásobné
- Rozdíly v účinnosti translace (spolu s regulací transkripce) umožňují buňce mít stovky a tisíce molekul nějakého proteinu a jen několik molekul jiného proteinu

Molekulární základ rozdílné translace tkví

- V přítomnosti translačního signálu na mRNA,
- Který se nazývá ribosomové vazebné místo
- Je to sekvence 6-8 nukleotidů na mRNA, která se páruje s komplementární sekvencí RNA malé ribosomové subjednotky
- Tato sekvence se nazývá Shineova-Dalgarnova

Sekvence Shineova – Dalgarnova - definice

- Sekvence přepisující se u bakterií z negativního DNA-řetězce do 5'konce mRNA jako 5'AGGA 3',
- Kterou se pak mRNA váže k sekvenci 3'UCCU 5', nacházející se na 3'konci 16S rRNA ribosomové subjednotky 30S
- a umožňuje v bakteriálních buňkách vazbu mRNA k ribosomu

Účinnost translace

- Závisí na síle vazby mRNA na ribosomovou RNA
- Čím je větší síla vazby, tím je větší iniciace translace

Expresní vektory *E. coli* byly optimalizovány

- aby bylo zajištěno, že mRNA klonovaného genu má silné ribosomové vazební místo (rbs)

K zabezpečení správné funkce rbs musí být

- sekvence vázající se na ribosom lokalizována v přesné vzdálenosti od translačního startovacího kodonu klonovaného genu
- DNA nesmí obsahovat sekvenci, která by po transkripci do mRNA tvořila vlásenky a tím bránila interakci mRNA s ribosomem – viz Obr. Příklad vlásenkové struktury

Vlásenková struktura mRNA (Glick a spol. 2003)

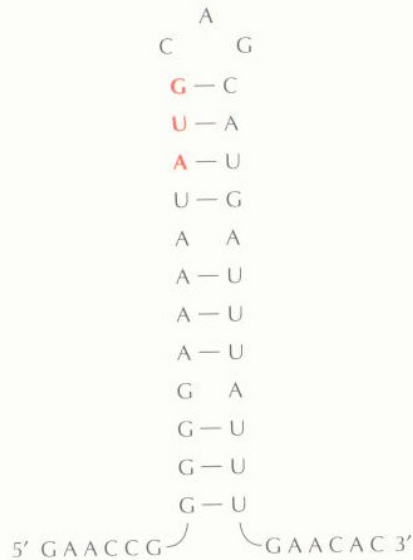


Figure 6.16 Example of secondary structure of the 5' end of an mRNA that would prevent efficient translation. The ribosome binding site is GGGGG, the initiator codon is AUG (shown in red), and the first few codons are CAG-CAU-GAU-UUA-UUU. The mRNA is oriented with its 5' end to the left and its 3' end to the right. Note that in addition to the traditional A-U and G-C base pairs in mRNA, G can also base pair to some extent with U.

Expresní vektor pKK233-2 s transkripčními a translačními signály

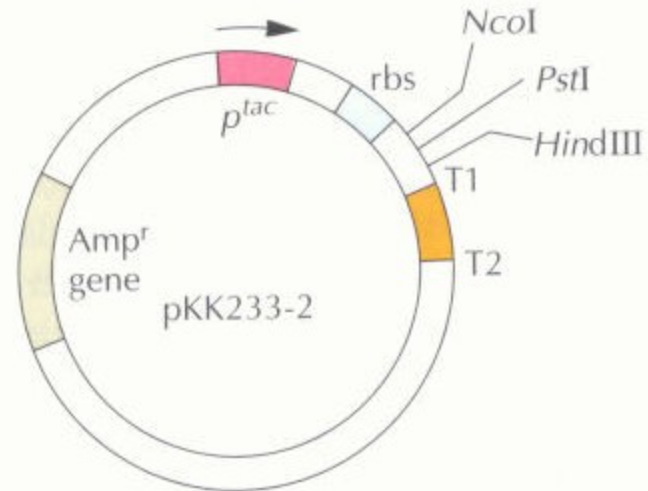
- Pro vysokou expresi klonovaného genu

Vektor obsahuje

- Gen pro ampicilin rezistenci (selekční marker)
- tac promotor
- rbs genu *lac Z*
- 3 klonovací místa (*NcoI*, *PstI*, *HindIII*)
- 2 sekvence pro terminaci transkripce (T1, T2)

Expresní vektor obsahující silné rbs (Glick a spol. 2003)

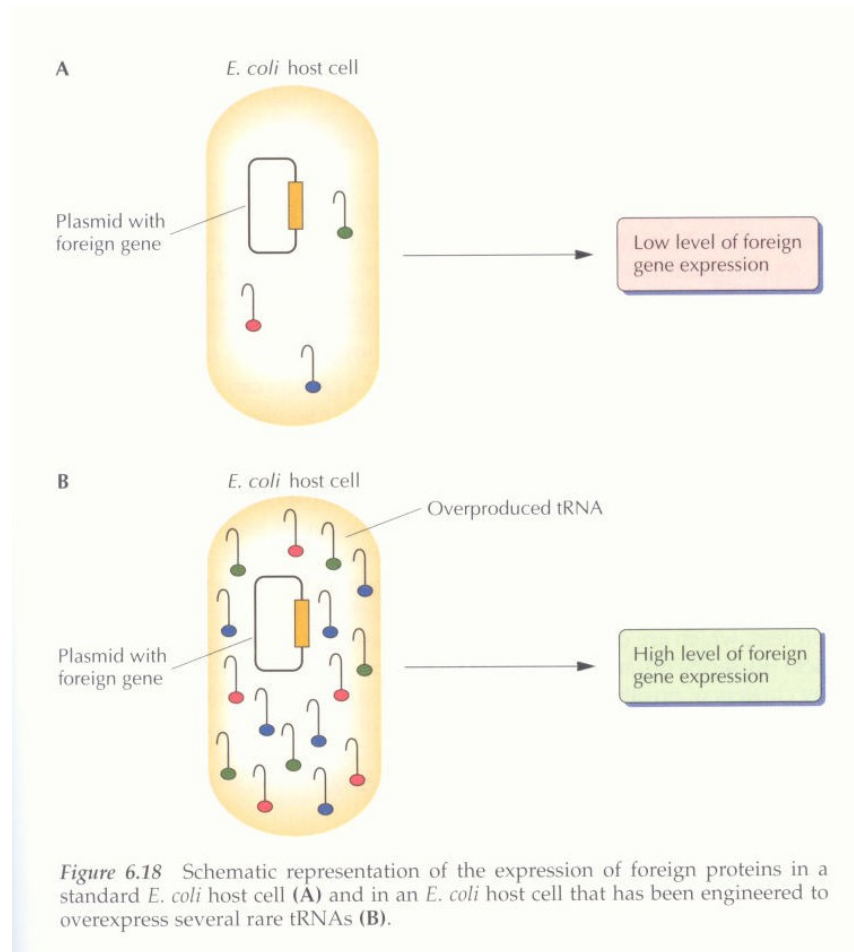
Figure 6.17 The expression vector pKK233-2. The plasmid pKK233-2 codes for the ampicillin resistance (Amp^r) gene as a selectable marker gene, the *tac* promoter (p^{tac}), the *lacZ* ribosome-binding site (rbs), three restriction endonuclease cloning sites (*NcoI*, *PstI*, and *HindIII*), and two transcription termination sequences (T1 and T2). The arrow indicates the direction of transcription. The plasmid is not drawn to scale.



Snížení produkce klonovaného proteinu může nastat

- Z důvodu malého množství molekul tRNA v buňce, když klonovaný gen obsahuje kodony málo využívané hostitelskou buňkou (genetický kód je degenerovaný a pro jednotlivé AK mohou být různé tRNA)
- Potom lze chemicky syntetizovat novou verzi genu s kodony, které jsou hostitelskou buňkou nejčastěji používány (tzv. optimalizace kodonu)
- nebo geneticky manipulovat buňky *E. coli* tak, aby syntetizovaly více vzácných tRNA

Schéma znázorňující buňky *E. coli* geneticky manipulované tak, aby produkovaly dostatečné množství vzácných tRNA (Glick a spol. 2003)



Další možnosti zvýšení produkce proteinu

- Je integrace cizorodé DNA do hostitelského genomu
- Je-li klonovaná DNA součástí chromosomu hostitelské buňky, je relativně stabilní

Integrace cizorodé DNA do hostitelského genomu

- Se využívá, když jsou problémy se stabilitou plasmidu
- Když je třeba zajistit, aby se klonovaná DNA v organismu udržela bez selekčního tlaku (v průmyslu je přidávání antibiotika do média finančně náročné)
- V buňkách se cizorodá DNA může udržet po několik generací bez selekčního tlaku

Integrační vektory

- Umožňují včlenit klonovaný gen do chromosomu hostitelské buňky
- K inserci nesmí dojít uvnitř genu, který je pro život buňky esenciální
- Klonovaný gen bývá obvykle vložen do chromosomu buňky tak, aby byl pod kontrolou regulovatelného promotoru

Pro integraci se využívá

- Homologní rekombinace
- Pro ni je nezbytná sekvenční homologie mezi integrující DNA a chromosomem

Pro integraci cizorodého genu do chromosomu buňky

- Byly zkonstruovány integrační vektory

Konstrukce integračního vektoru se skládá z těchto kroků

- 1. Identifikace vhodného místa na chromosomu buňky pro integraci tj. identifikaci úseku DNA, které může být porušeno bez ovlivnění normálních funkcí buňky
- 2. Izolace tohoto chromosomálního integračního místa a jeho klonování v integračním vektoru
- 3. Vligování klonovaného genu s regulovatelným promotorem do chromosomálního integračního místa
- 4. Přenos integračního vektoru s klonovaným genem do hostitelských buněk. Vektor je konstruován tak, že se v hostitelských buňkách nemůže replikovat
- Klonovaný gen se může exprimovat jen tehdy, když byl integrován do chromosomu hostitelské buňky.
- 5. Selektce a pomnožení hostitelských buněk, které exprimují klonovaný gen.

K integraci může dojít

- pomocí dvojitého crossing-overu – integruje se část integračního vektoru
- Jednoduchého c-o – integruje se celý integrační vektor

Integrace genu do chromosomu jednoduchým a dvojitým c-o (Glick 2003)

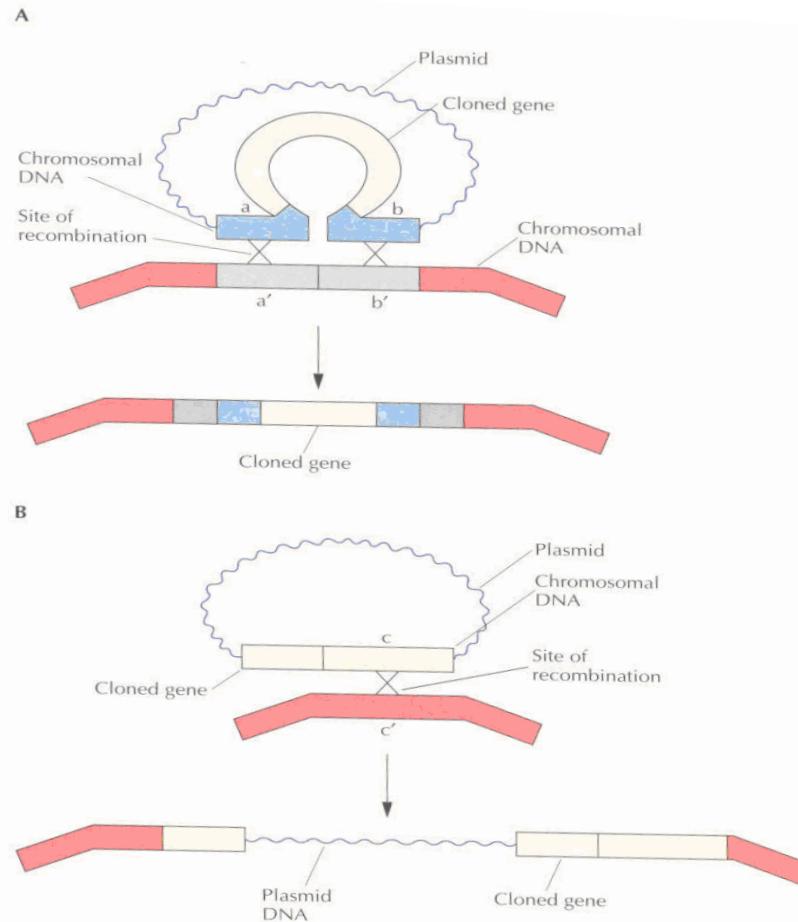


Figure 6.21 Integration of a cloned gene into a chromosomal site. **A.** The cloned gene has been inserted, on a plasmid, in the middle of a cloned segment of DNA (ab) from the host chromosome. Homologous DNA pairing occurs between plasmid-borne DNA regions a and b and host chromosome DNA regions a' and b', respectively. A double crossover event (X—X) results in the integration of the cloned gene. **B.** The cloned gene is inserted adjacent to the cloned DNA from the host chromosome (c). Homologous DNA pairing occurs between plasmid DNA region c and host chromosome DNA region c'. A single recombination event (X) within the paired c-c' DNA region results in the integration of the entire plasmid, including the cloned gene.

Ovlivňování místa sekrece cizorodého proteinu v buňce

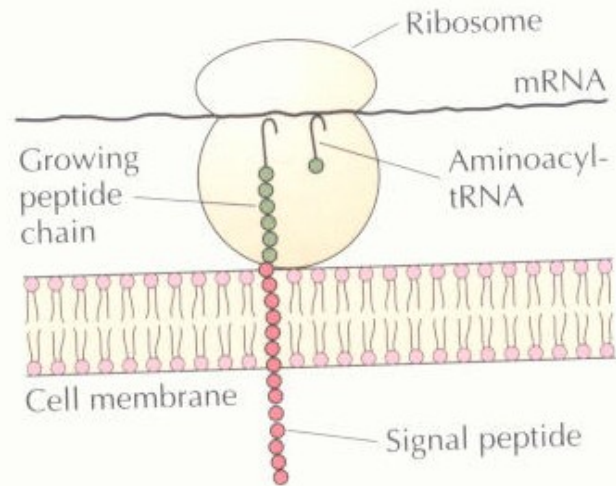
- Stabilita klonovaného proteinu často závisí na jeho lokalizaci v buňce
- Např. rekombinantní proinzulin je 10x stabilnější, je-li sekretován do periplasmy
- Proteiny sekretované do periplasmy nebo růstového média se snadněji purifikují

Signální peptid

- Na N-terminálním konci proteinu
- Ovlivňuje průchod proteinu bakteriální membránou
- Změnou signálního peptidu lze ovlivnit lokalizaci proteinu

Ovlivňování sekrece proteinu v buňce (Glick a spol.2003)

Figure 6.24 Schematic representation of protein secretion. The ribosome is attached to a cellular membrane, and the signal peptide (signal sequence, leader peptide) at the N terminus goes through the membrane followed by the rest of the amino acids that constitute the mature protein or peptide. Once the signal peptide has crossed the membrane, it is cleaved by an enzyme associated with the membrane called a signal peptidase. Membrane proteins as well as secreted proteins generally contain a signal peptide (prior to removal by processing).

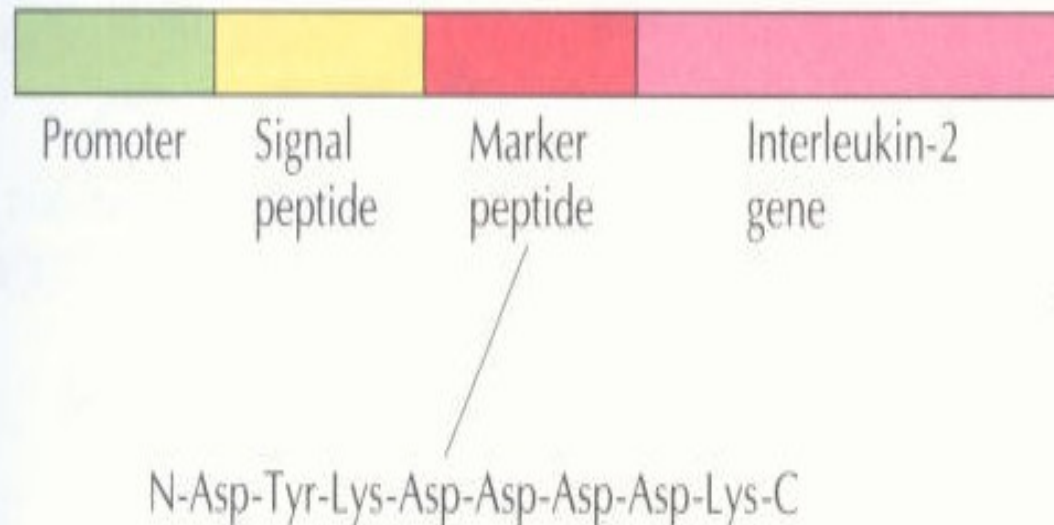


Byly připraveny klonovací vektory

- Pro produkci fusního proteinu se signálním a markerovým peptidem

Genetický konstrukt pro produkci fúzního proteinu se signálním a markerovým peptidem (Glick a spol. 2003)

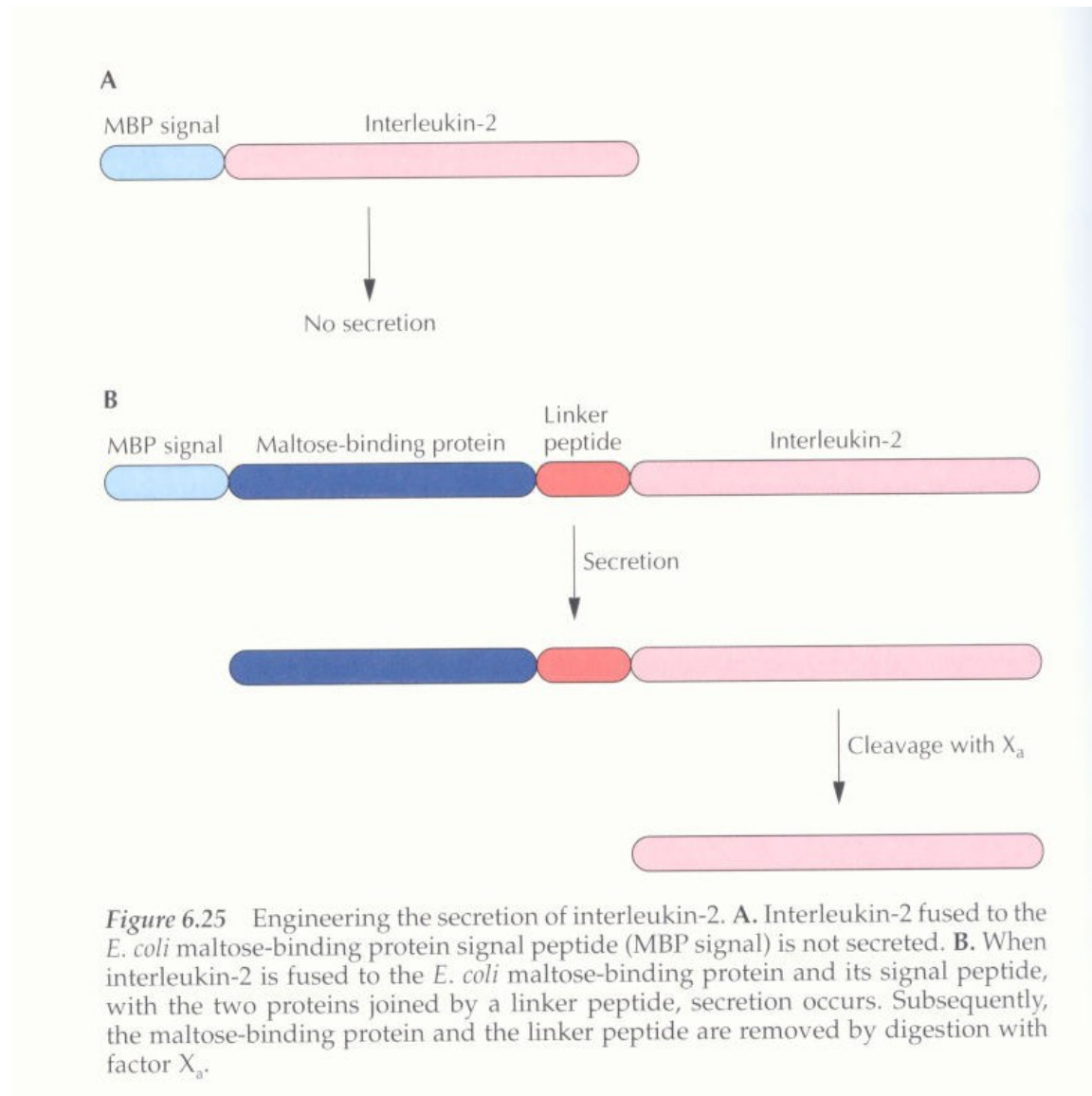
Figure 6.10 Schematic representation of the genetic construct used to produce a secreted fusion protein consisting of a marker peptide and interleukin-2. The amino acid sequence of the marker peptide is shown.



Další postupy

- Pro ovlivnění sekrece fusního cizorodého proteinu

Úprava sekrece interleukinu-2 (Glick a spol.2003)

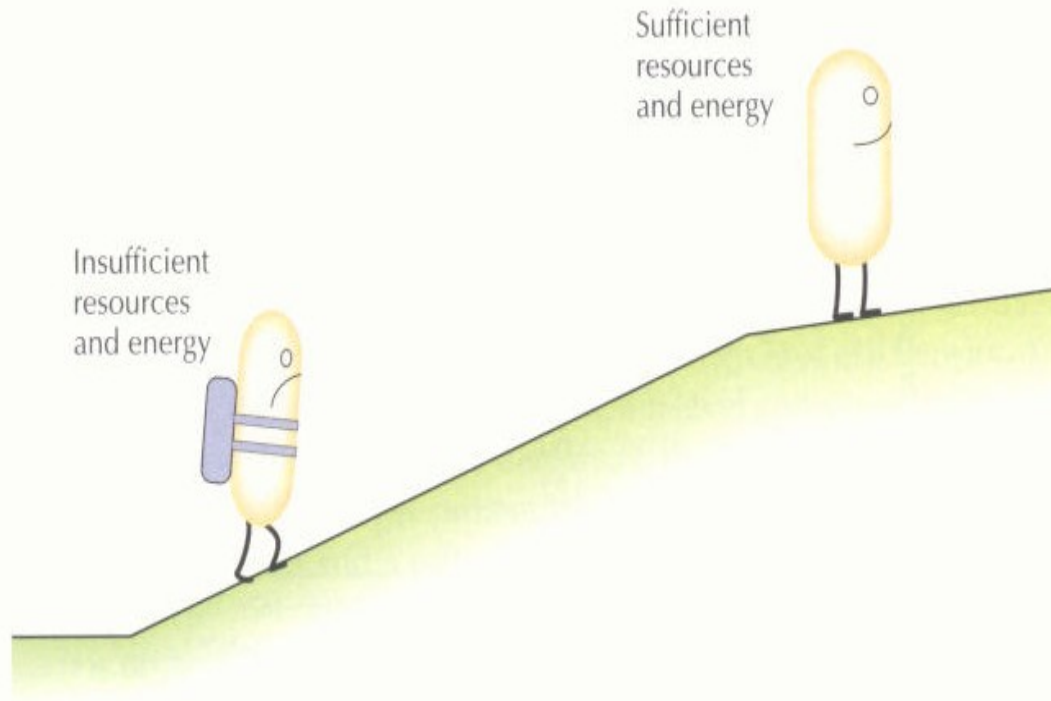


Nadprodukce proteinu

- Ovlivňuje růst buněk

Schématické znázornění metabolické zátěže při nadprodukci proteinu buňkou (Glick a spol. 2003)

Figure 6.27 Schematic representation of the biological consequences for a host cell of overexpressing a foreign protein and generating a metabolic load. When there is no metabolic load, the cell has access to sufficient energy and resources. The over-expression of a foreign protein—shown here as being akin to the cell's wearing a heavy backpack—prevents the cell from obtaining sufficient energy and resources for its growth and metabolism so that it is less able to grow rapidly and attain a high cell density.



Počet kopií plasmidů v buňce

- Ovlivňuje růst buněk

Vliv počtu kopií plasmidu na růstovou rychlost buňky (Glick a spol.2003)

Table 6.6 Effect of plasmid copy number on host cell growth rate

<i>E. coli</i> HB101 with plasmid	Plasmid copy number	Relative specific growth rate
None	0	1.00
A	12	0.92
B	24	0.91
C	60	0.87
D	122	0.82
E	408	0.77

Adapted from Seo and Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* 27:1668–1674, 1985.

The different plasmids, designated A, B, C, D and E, encode only β -lactamase and are all the same size. The growth rates were normalized to the growth rate value for *E. coli* HB101 without a plasmid.

Pro produkci proteinů lze použít jiné mikroorganismy než *E. coli*

Velké množství proteinů sekretují do růstového média vláknité houby (rod *Aspergillus*)