

Dr. Rákhely Gábor

Biokatalizátorok, enzimek előállítása,
módosítása. Fehérjetermeltetéshez szükséges
molekuláris módszerek, a kihozatalt
meghatározó celluláris folyamatok

Segédlet a BSc záróvizsgára való felkészüléshez

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen
készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Biokatalizátorok, enzimek előállítása, módosítása.
Fehérjetermeltetéshez szükséges molekuláris módszerek, a
kihozatalt meghatározó celluláris folyamatok.

Biológia BSc 19A tétel

Fehérje termeltető rendszerek

Prokarióta rendszerek

- ***Escherichia coli***: Gram-, jól ismert, könnyű kezelhetőség nagy mennyiségű biomassza, ismert vektorok, sokféle fehérje termeltethető benne, laboratóriumi törzsek, nem jól szekretál, nincs poszttranszlációs módosítási rendszere, belül reduktív atmoszféra
- ***Bacillus subtilis***: Gram+, jól ismert, iparilag használatos törzs, erős szekréciós képesség, de nincs poszttranszlációs módosítási rendszere, könnyű kezelhetőség, nagy mennyiségű biomassza, ismert vektorok, integrálódó vektorok

Eukarióta rendszerek

- **Élesztő**: gyorsan szaporodó eukarióta sejtvonalak, igen sok ismeretanyag, iparilag jelentős törzsek, könnyű kezelhetőség, ismert vektorok, replikálódó és integrálódó, jó szekréciós képesség, poszttranszlációs módosítások lehetősége – nem feltétlenül kompatibilis a magasabbrendű poszttranszlációs módosításokkal

Emlős sejtvonalak: sokfajta fehérje csak így termeltethető, tranziens expressziós rendszerek (relatív gyors, de korlátozott), stabil expressziós rendszerek (tapasztalatot és hosszú optimalizálást igényel), farmakológiailag pontos poszttranszlációs módosítások

Egyéb expressziós rendszerek: növényi illetve rovarsejtes expressziós rendszerek.

Stratégiák fehérjék túltermeltetésére

Homológ fehérjetermeltetés:

- A termeltetendő fehérje génje termelő organizmusból származik,

Heterológ fehérjetermeltetés:

- A termeltetendő fehérje génje nem a termelő organizmustól származik

A termelt fehérje akár a mennyisége akár a minősége miatt toxikus lehet a sejt számára

Konstitutív termeltetés:

- fehérje a teljes növekedési fázis alatt expresszálódik, egyszerűbb
- a biomassza termelés és a célfehérje expresszió egyidőben történik → növekedés gátlás, a fehérje termelés leköti a sejt energiáit
- Toxicitás esetén nem lehetséges – nincs biomassza képződés

Indukált termeltetés:

- A biomassza előállítása és a fehérjetermelés időben kettéválik
- Növekedés alatt represszált expresszió, egy adott időpillanatban a termelés bekapcsolása, derepresszió, aktiválás – általában transzkripciós szinten
- Általánosan használt
- A toxicitással kapcsolatos kérdések megoldhatóak

Génexpresszió szabályozása

Transzkripció szinten

- A transzkripció iniciációt befolyásoló szabályozási mechanizmusokon keresztül, legáltalánosabban használt szabályozási mechanizmus. A transzkripció elongációja során a génben terminációs szignálok kerülendők. Transzkripció terminációja Rho függő vagy független, a rendszer túlterheltségének elkerülésére kell használni

Posztranszkripció szinten

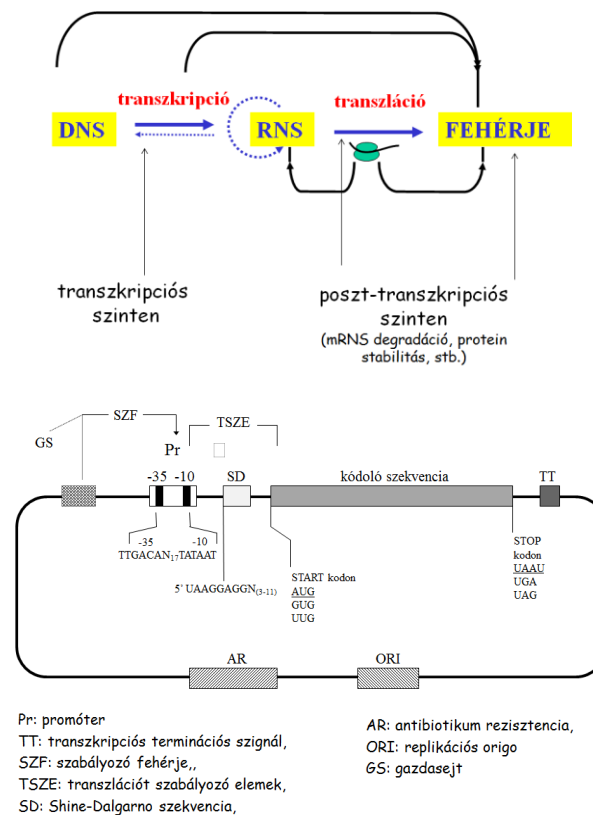
- A mRNS-ek degradációja prokariótákban meghatározó, a cél mRNS-eket stabilizálni kell

Transzláció szinten

- A transzláció iniciációjának szintjén fontos a cisz elemek megfelelő minősége, szerveződése
- A transzláció elongációjánál a célgén kodonpreferenciájának beállítása a gazdasejthez, megoldás génszintézis, vagy a gazdasejt kodonpreferenciájának beállítása
- Termináció: a rendszer túlterheltségének elkerüléséhez kell

Poszttranszlációs szinten

- A fehérjék stabilitásának megóvása, proteázok eltávolítása, szekréció, inclusion body termeltetés.
- Fehérje folding: a termeltetés és a fehérje folding összhangba hozása, aktív fehérjék képződése
- Az expresszió és a szekréció sebességének összehangolása



Génexpresszió szintjének monitorozása

Aktivitás szinten:

- A fő cél minél több aktív fehérjét termeltetni – módszer: aktivitás mérés (ha van aktivitás)

Fehérje szinten

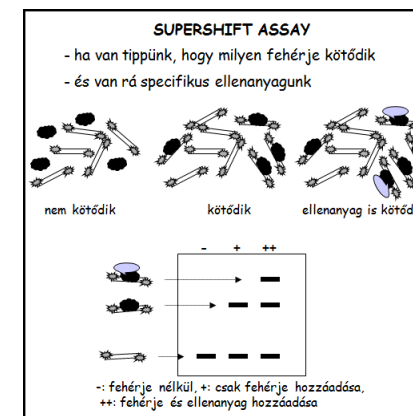
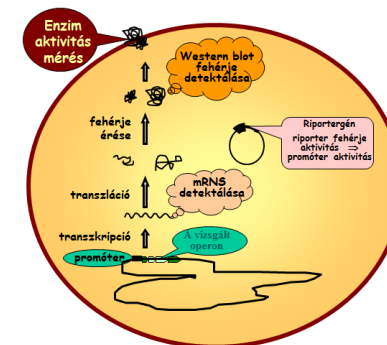
- Ha nincs aktivitás: fehérje sincs, vagy nem aktív – módszer: Western blot technika

mRNS szinten

- Ha nincs fehérje, van-e transzkript – módszer: Northern blot vagy RT-qPCR

Riporter gének fehérjék

- Az expresszió szabályozásának modellezésére alkalmasak, modell gén/fehérjék segítségével, LacZ, Gfp



DNS fehérje kölcsönhatások tanulmányozás

Elektromobility shift assay (EMSA)

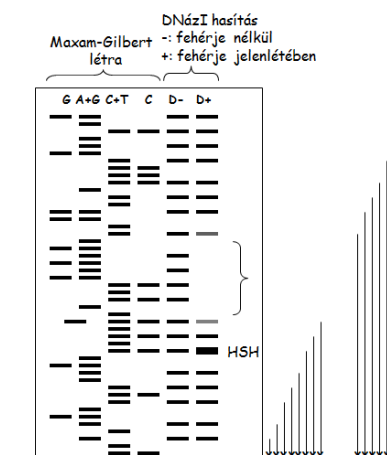
- Megmondható, hogy egy DNS köt-e fehérjét, milyen erősen, supershift assay-val a fehérje minődésége is meghatározható

Dnáz I footprint

- Arra ad választ, hogy a fehérje/fehérjék hova kötődik a DNS-en, továbbfejlesztésük az interferencia esszék

UV keresztkötés

- A DNS kötő fehérje mérete becsülhető



Transzkripció szabályozása

Transzkripció iniciációja prokariótákban

- Transzkripció iniciációja: Holoenzim = RNS polimeráz + σ faktor (ez utóbbiból több van, típusuk, expressziós szintjük változó, háztartási gének σ^{70})

Operon: Közös szabályozás a gének egy transzkripten

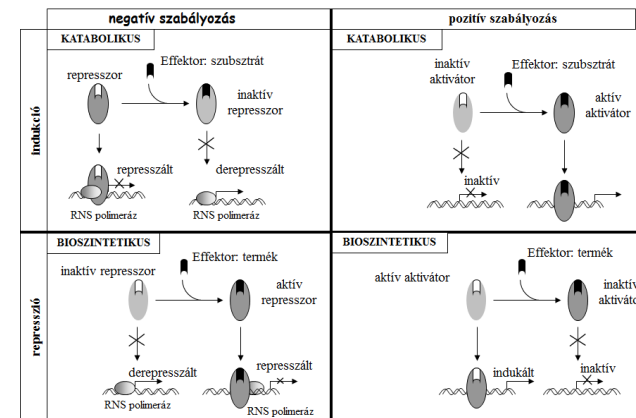
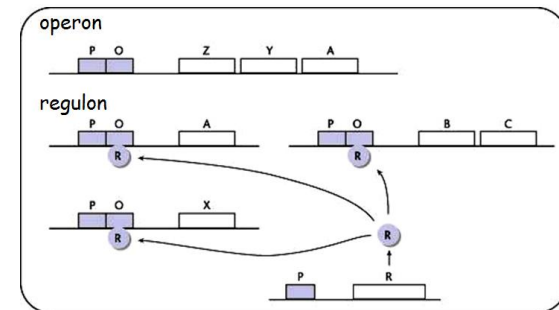
Regulon: Közös szabályozás, a gének több transzkripten

Globális transzkripciós faktorok

A genomban igen sok gén expressziójának szabályozása, pl FNR, kétkomponensű szabályozó rendszerek (ArcAB, NarX/L, P/Q, CAP)

Lokális transzkripciós faktorok

Egy adott gén, géncsoport szabályozásáért felelős, pl LacI

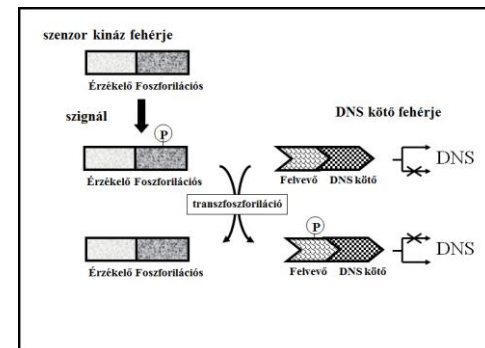


E. coli génexpressziós rendszerekben használt szabályozó mechanizmusok

lac szabályozás: kettős szabályozás, laktóz/allolaktóz indukál/derepresszál LacI represszoron keresztül, glükóz primer szénforrás, glükóz deaktivál cAMP/CAP rendszer. Hátrányok: szivárgó rendszer (permeáz, LacZ katalizálta allolaktóz), glükóz gátlás (megoldás, lacUV5/tac promóter)

trp szabályozás: transzkripció/ transzkripció+transzláció szinten – attenuáció, hátrány: tápanyagelvonással kell indukálni

araC szabályozás: arabinóz szabályozás AraC-n keresztül hangolható promóter



Poszttranszkripció szabályozás, mRNS degradáció

- A mRNS-ek lebomlása sokkal gyorsabb prokariótákban, mint eukariótákban, alkalmazkodási mechanizmus
- Vizsgálati módszerek: transzkripció gátlás, RNáz gének deléciója, Northern blot, RT-qPCR
- A koregulált policisztronos struktúra nem jelenti a cisztronok azonos mennyiségét transzkripció szinten, a mRNS degradációja felülírja
- Stabilitást meghatározó tényezők: mRNS struktúra, környezeti tényezők, degradációs apparátus

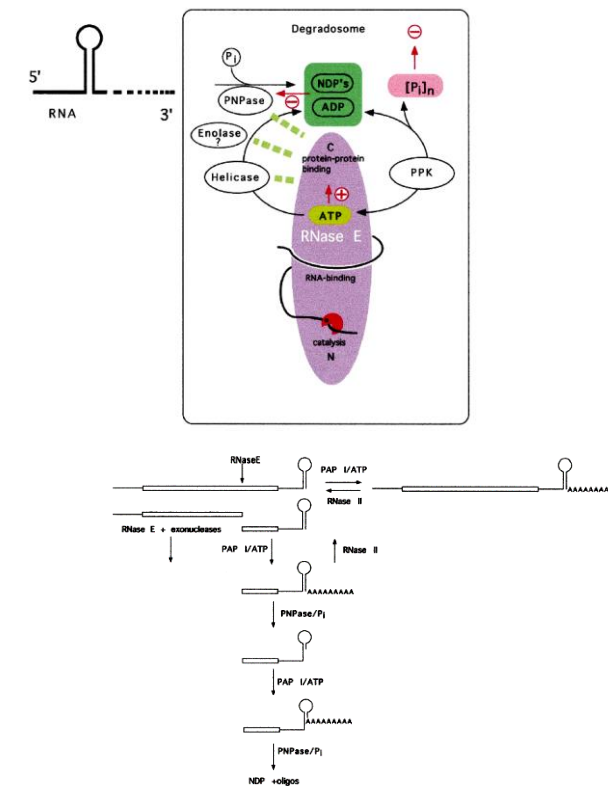
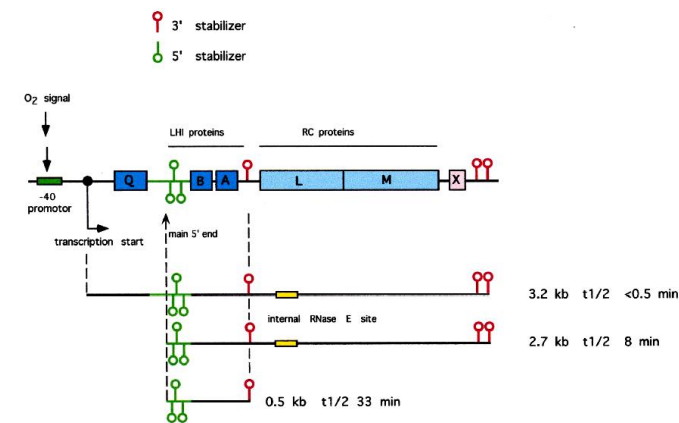
mRNS degradációban résztvevő komponensek *E. coli*-ban

Degradoszóma

- Endoribonuclease E (RNáz E): endoribonukleáz aktivitás, scaffold fehérje, 5' monofoszfátot preferál, 5' trifoszfát stabilizál
- PNPase (polynucleotide phosphorylase): 3' → 5' foszfát függő processzív exonukleáz, poliadenilációs aktivitás
- Polyphosphate Kinase (PPK): ATP regeneráció, polifoszfát (gátolja a degradációt) eltávolítás
- ATP függő DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) helikáz: a másodlagos struktúrák kinyitása, széttekerése

Egyéb enzimek

- RNáz II: a sejt 3' → 5' exoribonukláz aktivitásának 90%-a. a PNPáz-zal együttes deléciója letális !!!
- PolyA polimerázok – cDNS-ek készíthetőek prokarióta mRNS-ekből is.



Transzlációt befolyásoló tényezők

Transzláció iniciációja

Főbb lépései:

Több lépcsőben transzlációs iniciációs komplex képződése

50S+30S + IF1, IF2, IF3, fMet-tRNSMet+ mRNS

Befolyásolható – elsősorban cisz – elemek

- Start kodonok – AUG, GUG TUG
- Shine-Dalgarno szekvencia: komplementer a 16S rRNS 3' végéhez
- A két előbbi elem távolsága (!), köztük levő szekvencia minősége.
- Upstream nem-transzlálódó szekvenciák: fehérje kötés, de inkább mRNS stabilitás

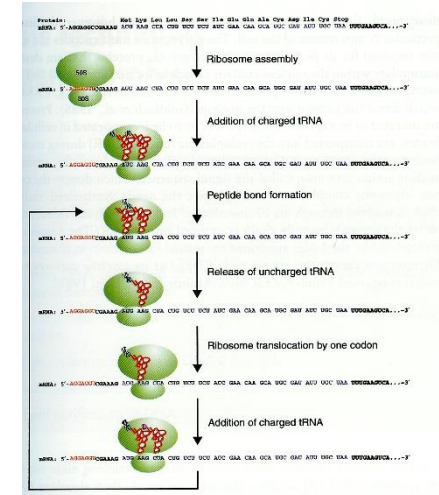
Transzláció elongációja

Meghatározó heterológ fehérjeexpresszió esetén

- Kodon preferencia: a gén illetve a gazdasejt - háztartási – génjeinek kodon preferenciájának harmonizálása
- Kodon preferencia: kódoló gének illetve horizontális géntranszferek jóslására is használható
- Megoldás:
gének újraszintetizálása a gazdasejt kodonpreferenciájának megfelelően
gazdasejt tRNS készletének bővítése, bevitt ritka tRNS génekkel

Transzláció termináció

Stop kodonok : UAA (RF1, RF2), UGA (RF1), UAG (RF2),



Fehérje stabilitás kérdésköre – proteolízis *E. coli*-ban

Proteolitikus enzimek – proteázok

Két fő család: ATP függő és ATP független proteázok (ATP-áz aktivitás nem a peptid hanem a másodlagos kötések felbontásához kell)

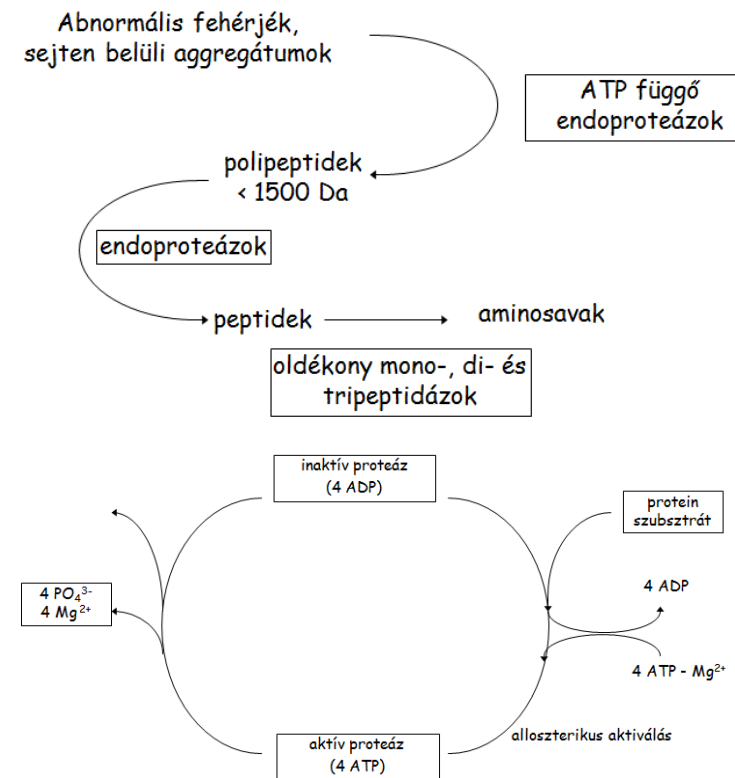
- ATP függő proteázok, Lon illetve ClpA/P. Lon a fő – szerin – homotatramer proteáz, Clp heteromultimer: ClpA: ATP-áz, ClpP: protáz alegység. Mind a kettő szerin protáz, hősokk szigma faktor regulálja, deléciójuk lehetséges fenotipikus hatásokkal: poliszaharid burok képződés, UV érzékenység. Megoldás fermentációs eszközökkel vagy genetikai megoldásokkal: *cps*, *gale*, *rsc*, *sulA* mutációk.
- Nem ATP függő proteázok: endoproteázok, endopeptidázok: a 1,5 kDa-nél kisebb peptidek további bontása egészen aminosavakig.
- Egyéb proteázok: OmpT, DegP membrán/periplazmatikus protázok, < 4%

Fúziós fehérjék

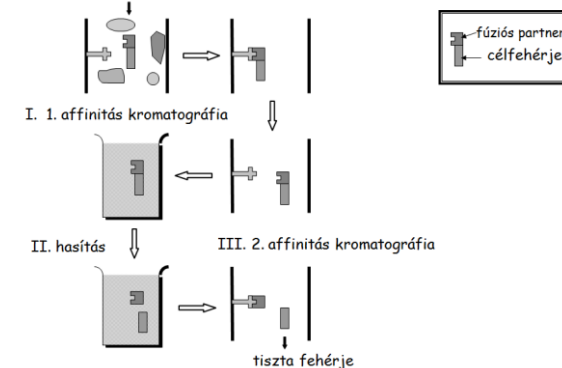
A fúziót gén szinten hozzuk létre úgy, hogy a fúziós partnerek génjeit a megfelelő leolvasási keretben úgy klónozzuk össze, hogy az 5' vég felőli génhez tartozó transzlációs stop kodon ne szerepeljen. Így egy polipeptidláncot kapunk, amelyben a kiindulási fehérjék egymást követő régiókként, doménekként helyezkednek el.

Előnyei: Óriási előny a tisztítás során, affinitás oszlopok

Kis peptidek esetén a fúzió proteolitikus stabilitást jelenthet szignálpeptiddel való fúzió, szekretált fehérje



A fúziós fehérjék tisztításának elve



Fúziós fehérjék

Fúziós lehetőségek:

- N- vagy C-terminális fúzió, tandem fúziók, kombinált fúziók, szekréción szignál szekvenciával való fúzió – szekréciónhoz
- Fontos megállapítani a termeltetni kívánt fúziós fehérje 3D szerkezetét – ha a fúziós partner a fehérje belsejébe kerül a tisztítás nem működik. Előre kell tervezni, számítógépes modellezéssel.
- Fúziós partnerekkel befolyásolható a termék oldékonysága mind oldható (MBP, GST) mind oldhatatlan irányban (trpII, CII)

Fúziós partner leválasztása

Kémiai, de inkább biológiai módszerekkel

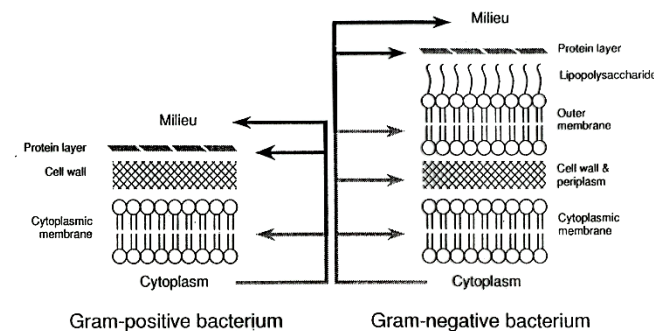
Használatos enzimek: X-faktor, trombin, enterokináz stb. Fontos, hogy a proteázok a felismerési szekvencia C-terminálisánál hasítsanak.

Fehérje szekréción *E. coli*-ban

A megtermelt fehérje kijuttatása az extracelluláris térbe, periplazmába vagy a membránokba

Előnyei

- A tisztítás sokkal egyszerűbb, a termék a sejtektől könnyen elválasztható
- Folyamatos fermentáció lehetséges membránreaktorban
- A periplazma illetve az extracelluláris tér sokkal oxidatívabb, korrektebb protein folding
- A fehérje degradáció sokkal csekélyebb mértékű, proteolitikusan stabilabb termékek *E. coli* esetén



Fehérje szekréció *E. coli*-ban

Fő protein transzport mechanizmusok baktériumokban

Kotranszlációs transzport:

SRP, signal recognition particle, és receptora, *E. coli* homológ: Ffh forty five homolog, FtsY

Poszttranszlációs transzport

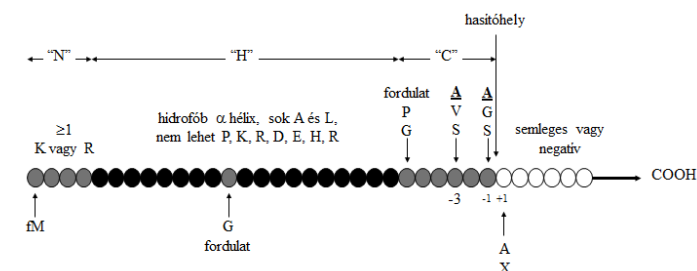
Sec útvonal: egyszerű kofaktor mentes polipeptidekre

Tat útvonal: több alegységes enzimekre, amelyek kofaktorokat is tartalmaz(hat)nak
transzport: a fehérje összeszerelődése után

Szignál szekvenciák Gram- baktériumokban

N-terminális: pozitívan töltött aminosavak, H: hidrofób régió, kompatibilis a membrán vastagságával, hasítási motívum: AlaXAla↓Ala

Sorsa: transzportot követően szignál peptidázok lehasítják ⇒ a végleges fehérje kisebb, mint a gén által jósolható.

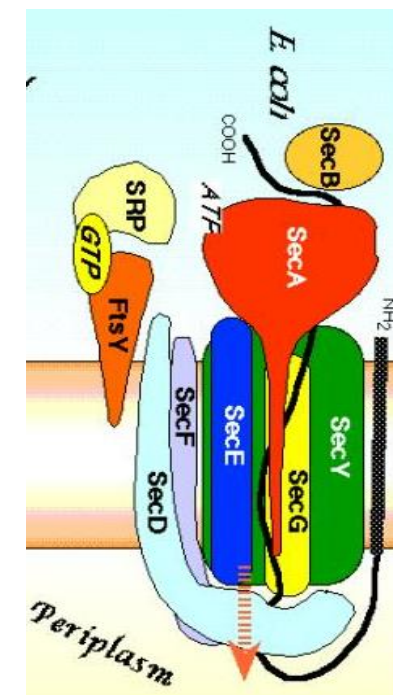


Sec útvonal

Poszttranszlációs transzport egyszerű fehérjék exportjára

Komponentszek:

- SecA, 102 kDa, citoplazmatikus, és belső membránkött, ATP-áz aktivitás, pumpa fehérje kölcsönhatás a szállítandó fehérjével.
- SecB, chaperon fehérje, nem engedi a foldingot, szekréció-kompetens állapotban tartja a fehérjét
- SecEFG: csatorna fehérjék
- SecD: leválasztás a periplazmába



Tat útvonal – poszttranszláció

- ## SRP transzport - kotranszláció

-
- The diagram illustrates the translocation of proteins across the ER membrane, showing three main pathways:
- Co-translational translocation:** A ribosome (pink) with a nascent polypeptide chain (red) is bound by a Signal Recognition Particle (SRP, yellow). The complex docks onto the SecYEG (blue) and SecE (blue) pore in the ER membrane. The polypeptide is threaded through the pore as the ribosome moves.
 - Post-translational translocation:** A protein (red) is synthesized in the cytosol and then translocated through a pore formed by SecYEG and SecE. This process is driven by the binding of a protein like BIP (pink) in the lumen.
 - Translocation of a protein with a signal sequence:** A protein with a signal sequence (red) is translocated through a pore formed by SecYEG and SecE. The signal sequence is threaded through the pore.
- The diagram is labeled with 'Cytosol' and 'Periplasm' to indicate the compartments. The ER membrane is shown as a lipid bilayer. The polypeptide chain is shown as a red line. The SRP is shown as a yellow shape. The SecYEG and SecE proteins are shown as blue shapes. The BIP protein is shown as a pink shape. The signal sequence is shown as a red line. The diagram also shows the translocation of a protein with a signal sequence (red) through a pore formed by SecYEG and SecE.