

Fehérje expressziós rendszerek

Gyógyszerészi Biotechnológia

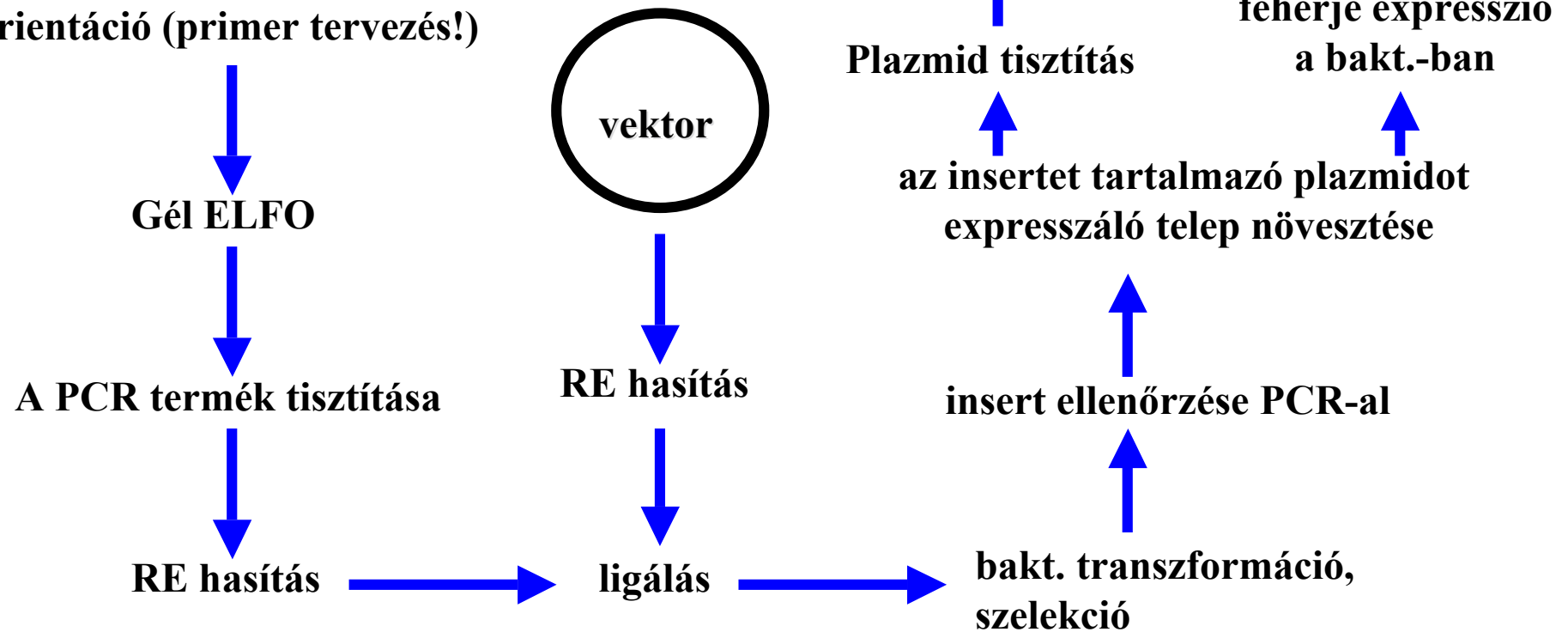


Expressziós rendszerek

- **Cél: rekombináns fehérjék előállítása nagy tisztaságban és nagy mennyiségben kísérleti ill. gyakorlati (therapia) felhasználásokra**
- **A gén szekvencia klónozása még nem garantálja a jó expressziót**
- **Fontosak a plazmidokba beépített regulációs szekvenciák (promoter, replikációs origo)**

Klónozás lépései

- Teljes gén PCR (start – stop kodon)
- A PCR termék két végén restrikciós hasítási hely: ragadós vég, megfelelő orientáció (primer tervezés!)



A gazdaszervezet kiválasztása



- *E.coli* – sok tapasztalat, könnyű kezelhetőség DE Gram neg. - sejtfal, LPS
- Gram poz. Baktériumok (*Bacillus*)
- Fonális gomba (*Aspergillus nidulans*)
- Élesztő
- Magasabb szintű eukarióta sejtkultúrák



□ **Transzformáció:** idegen DNS bevitele
bakt.-ba ill. élesztőbe

□ **Transzfekeció:** idegen DNS bevitele
eukariótába

Promoterek

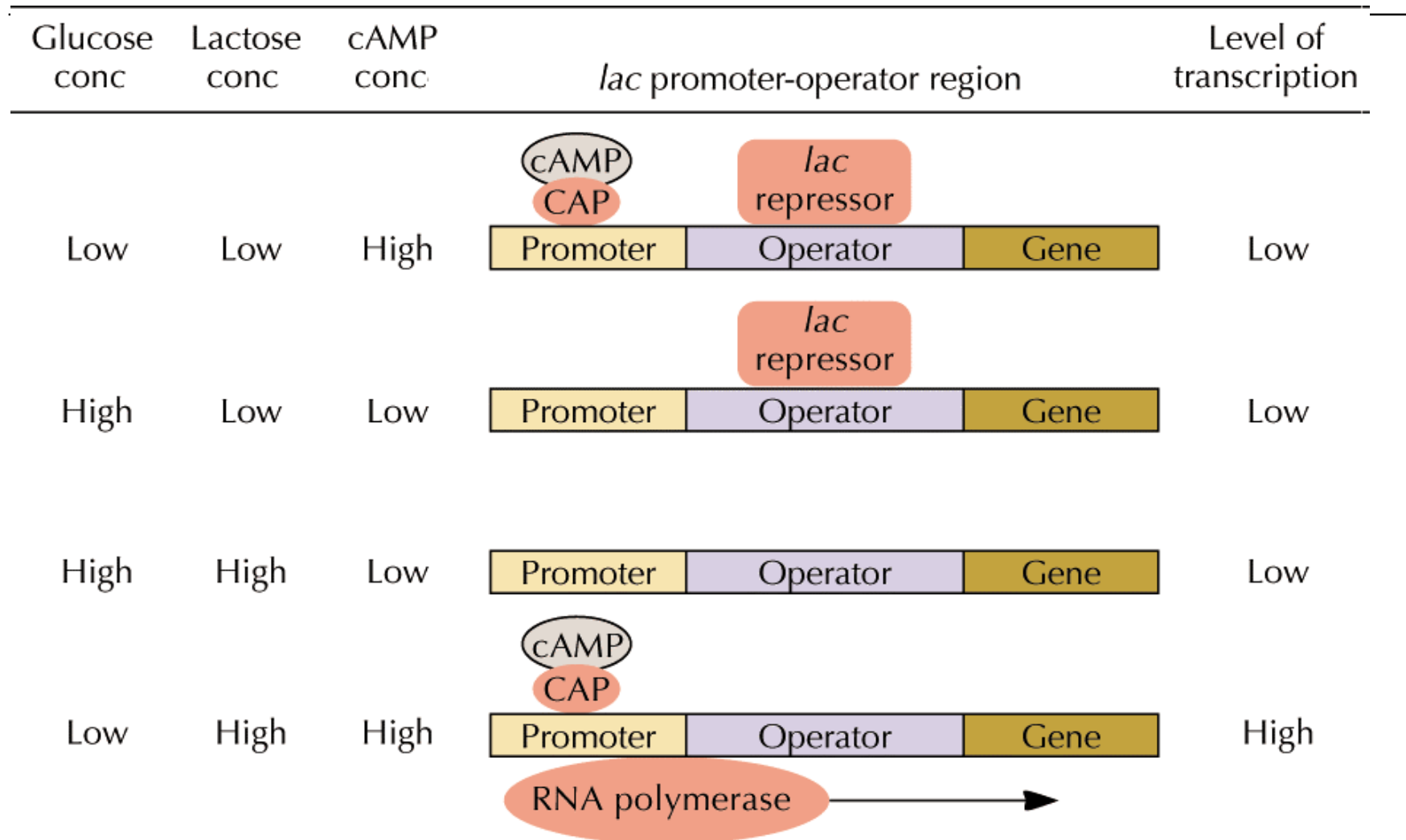
- A fehérje expresszió transzkripció szinten a legerősebben szabályozott
- A transzkripciót a promoter irányítja
- A promoterek két legfontosabb tulajdonsága:
 -  **erős** - magas affinitással köti az RNS Polimerázt, gyakori átírás
 -  **szabályozható** – az expresszió külső befolyásolhatósága, inducer v. ko-represszor szekvenciák



Bakteriális promoterek

- **lac**
- **trp**
- **tac**
- **λ p^L**
- **T7 fág gén 10**

lac promoter (operon)



trp promoter

□ Származás: *E. coli trp* operonból

□ Szabályozás:

trp represszor – önmagában inaktív

triptofán – ko-represszor

trp represszor + triptofán = aktív forma



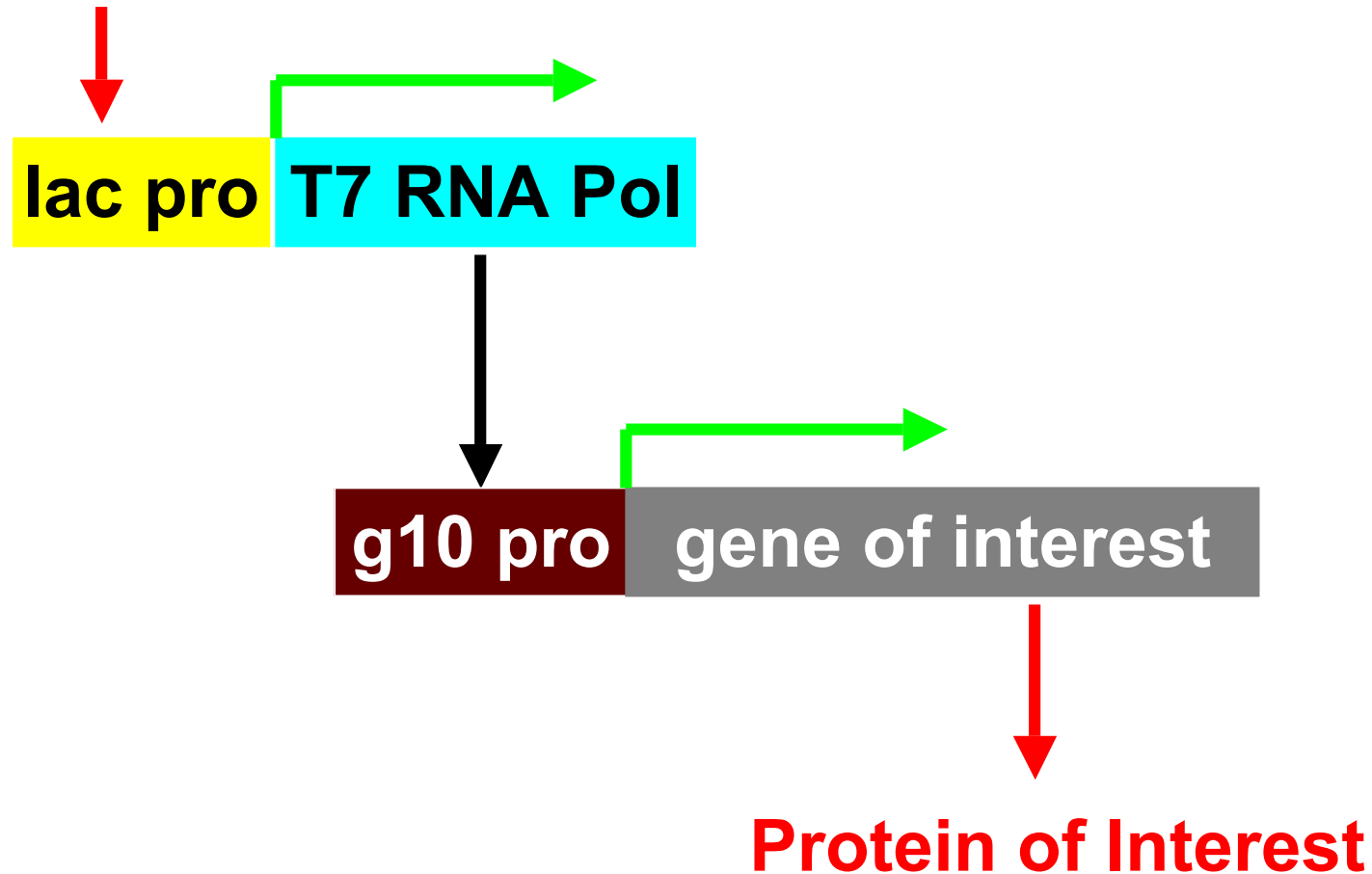
Génexpresszió gátlása

λ p^L promoter

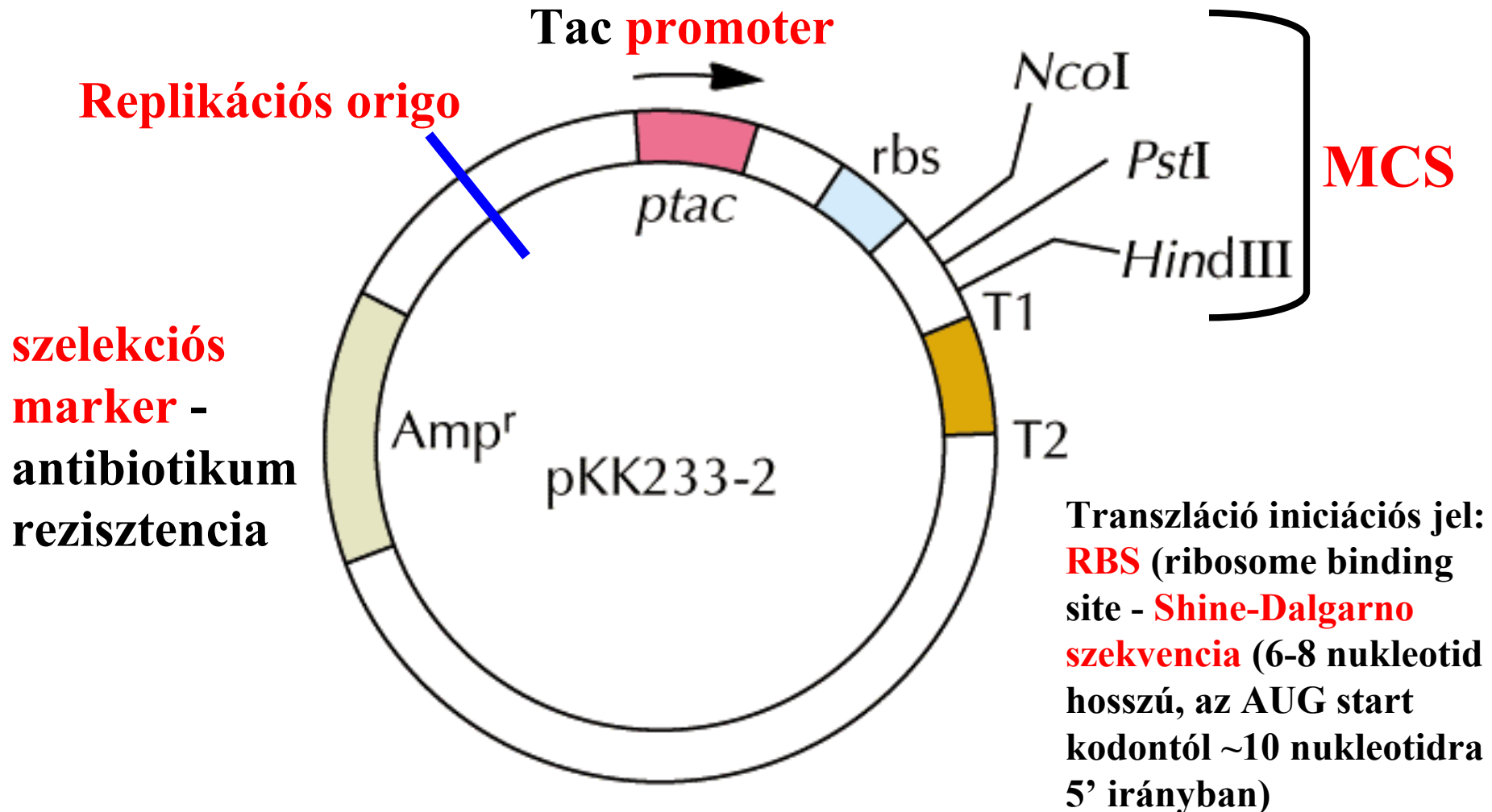
- p^L promoter szabályozója a λ represszor
- A λ represszort a cI gén kódolja
- cI kondicionális mutáns – hőmérséklet érzékeny expresszió
 - 28 – 32 °C – permisszív hőmérséklet \longrightarrow cI gén átíródik \longrightarrow λ represszor gátolja a p^L promotert \longrightarrow \emptyset rekombináns feh. expresszió
 - 42 °C – restriktív hőmérséklet \longrightarrow cI gén nem íródik át \longrightarrow λ represszor gátlás megszűnik \longrightarrow rekombináns feh. expresszió

T7 fág gén 10

inducer



Prokarióta expressziós vektor





Transzformációs technikák




□ **Elektroporáció**

□ **CaCl₂**

Fúziós fehérjék

Gyakori probléma a rekombináns fehérjék gyors lebomlása a gazdasejtben, nehéz tisztítás.

Megoldás:

-  **a rekombináns fehérjét vmilyen struktúrfehérjéhez kötik**
-  **fúziós fehérjét kódoló gén expressziója**
-  **szekrécións szignál szekvencia**

Fúziós rendszerek

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 ²⁺	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., 1994, *Trends Biotechnol.* **12**:184–188.

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.



Eukarióta expressziós rendszerek

- Lehetséges problémák a prokarióta rendszerekkel, ha eukarióta fehérjét szeretnénk expresszáltatni: instabilitás, biológiai inaktivitás, bakteriális kontamináció
- A legtöbb eukarióta feh. **posztranszlációs módosulás**on esik át – prokariótákban erre nincs lehetőség



Posztranszlációs módosulások

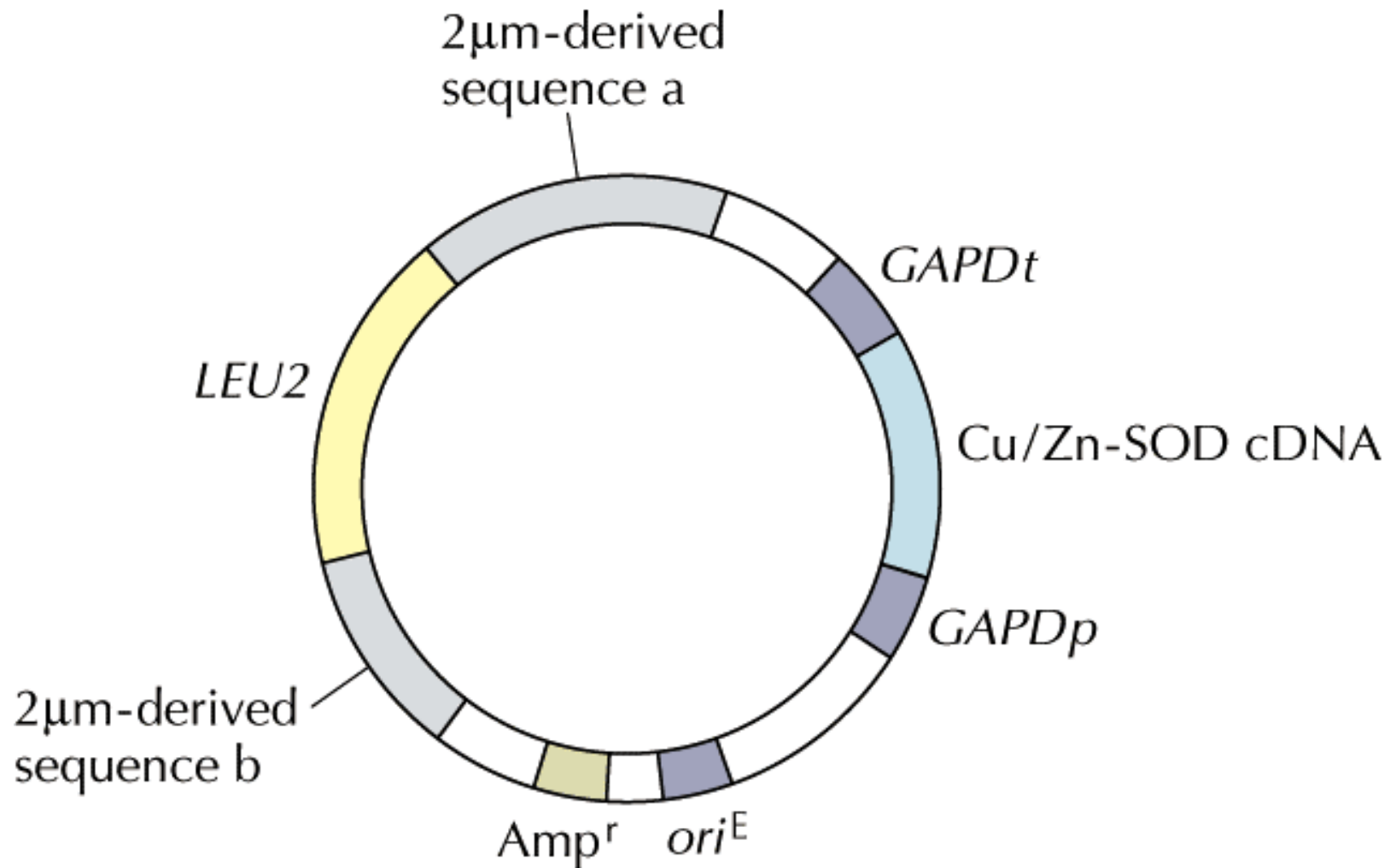
- **Diszulfid hidak képződése**
- **Proteolitikus hasítás**
- **Glikoziláció**
- **Aminosavak módosulása:**
 - **Foszforiláció**
 - **Acetiláció**
 - **Szulfatáció**
 - **Zsírsvav hozzáadás**



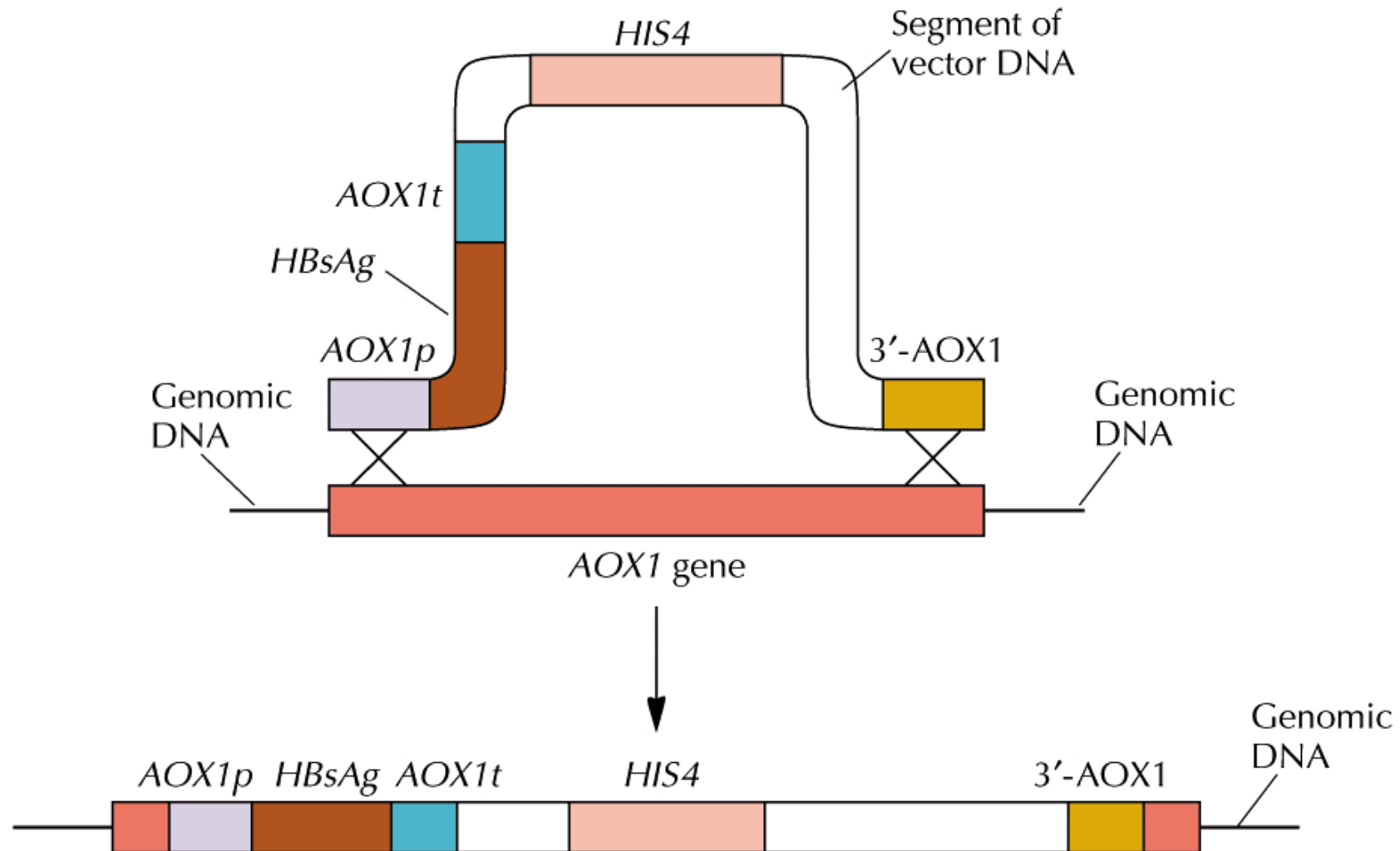
Élesztő expressziós vektorok

- **Episzmális**
- **Integrálódó**
- **Élesztő mesterséges kromoszóma (YAC = yeast arteficial chromosome)**

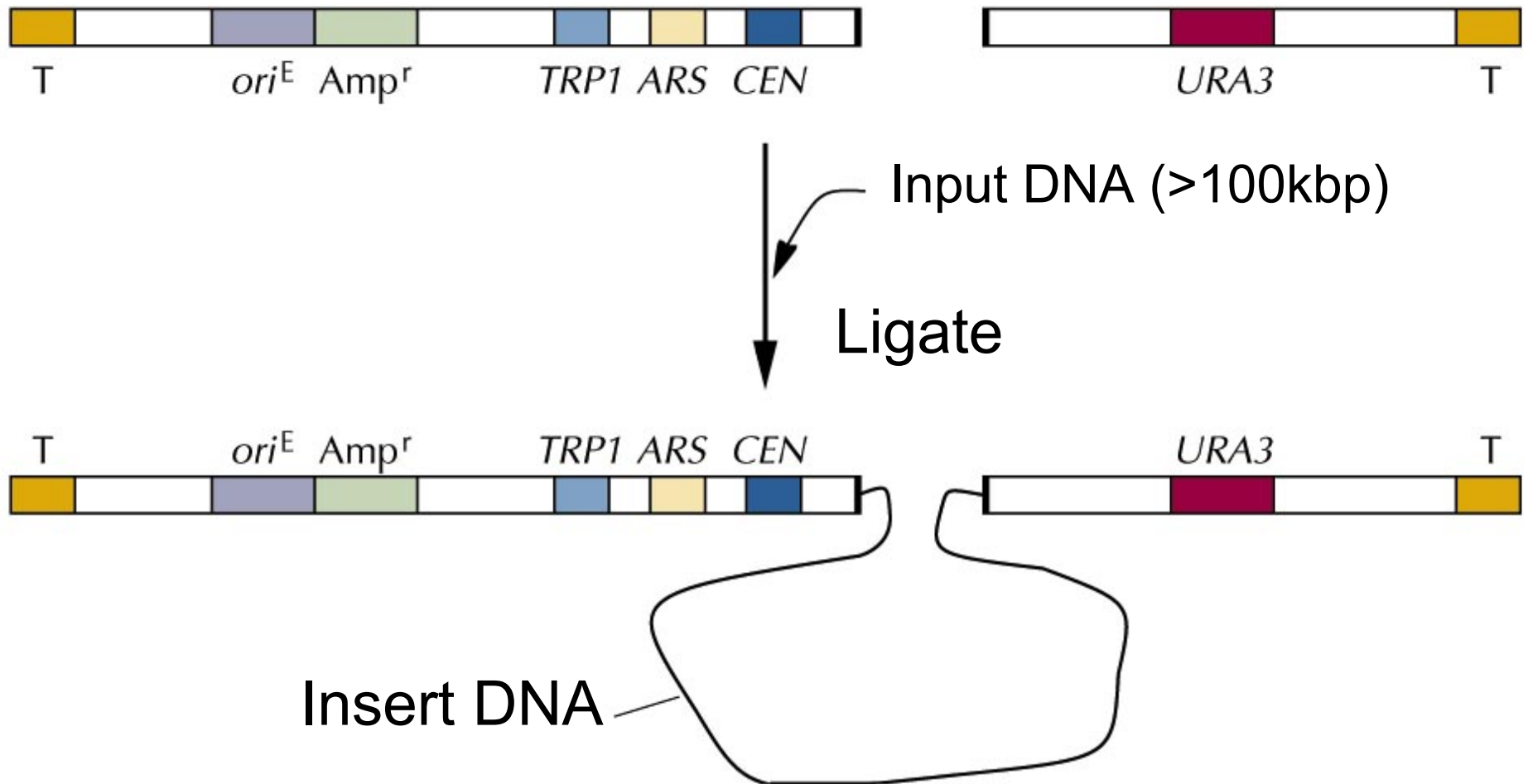
Episzmális



Integrálódó



YAC



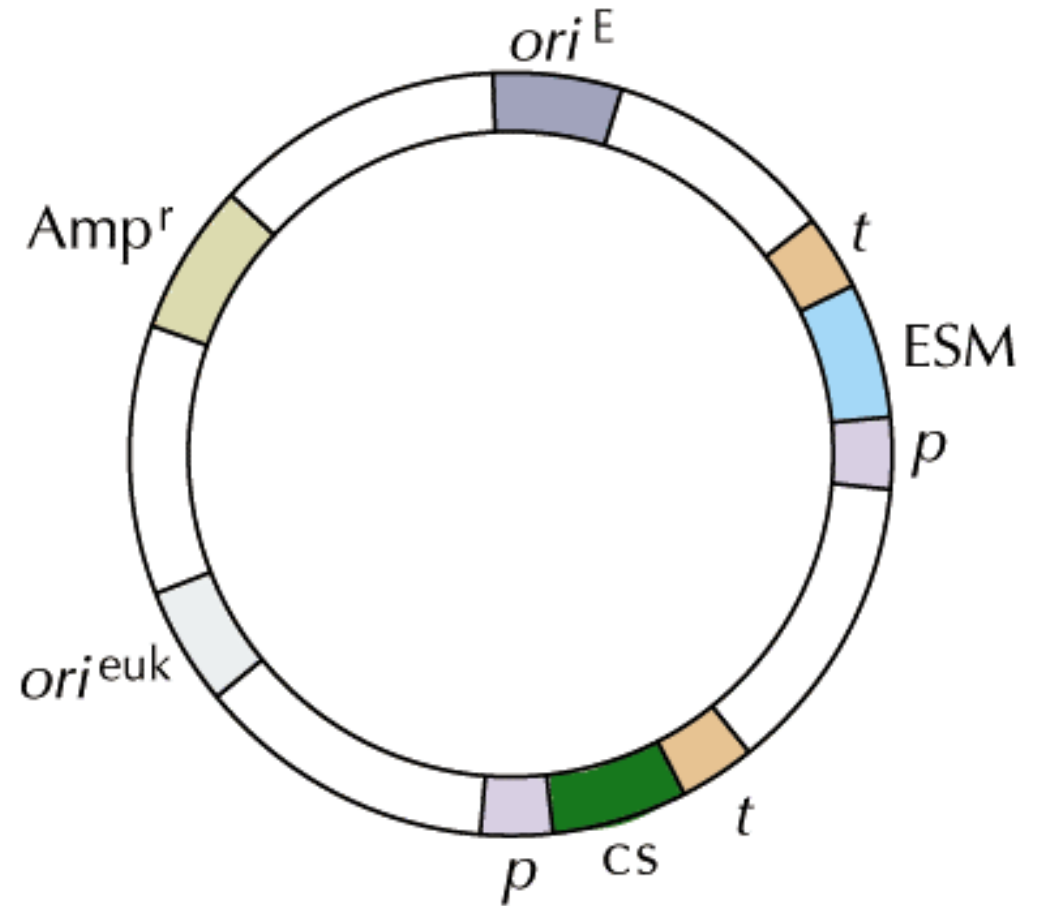


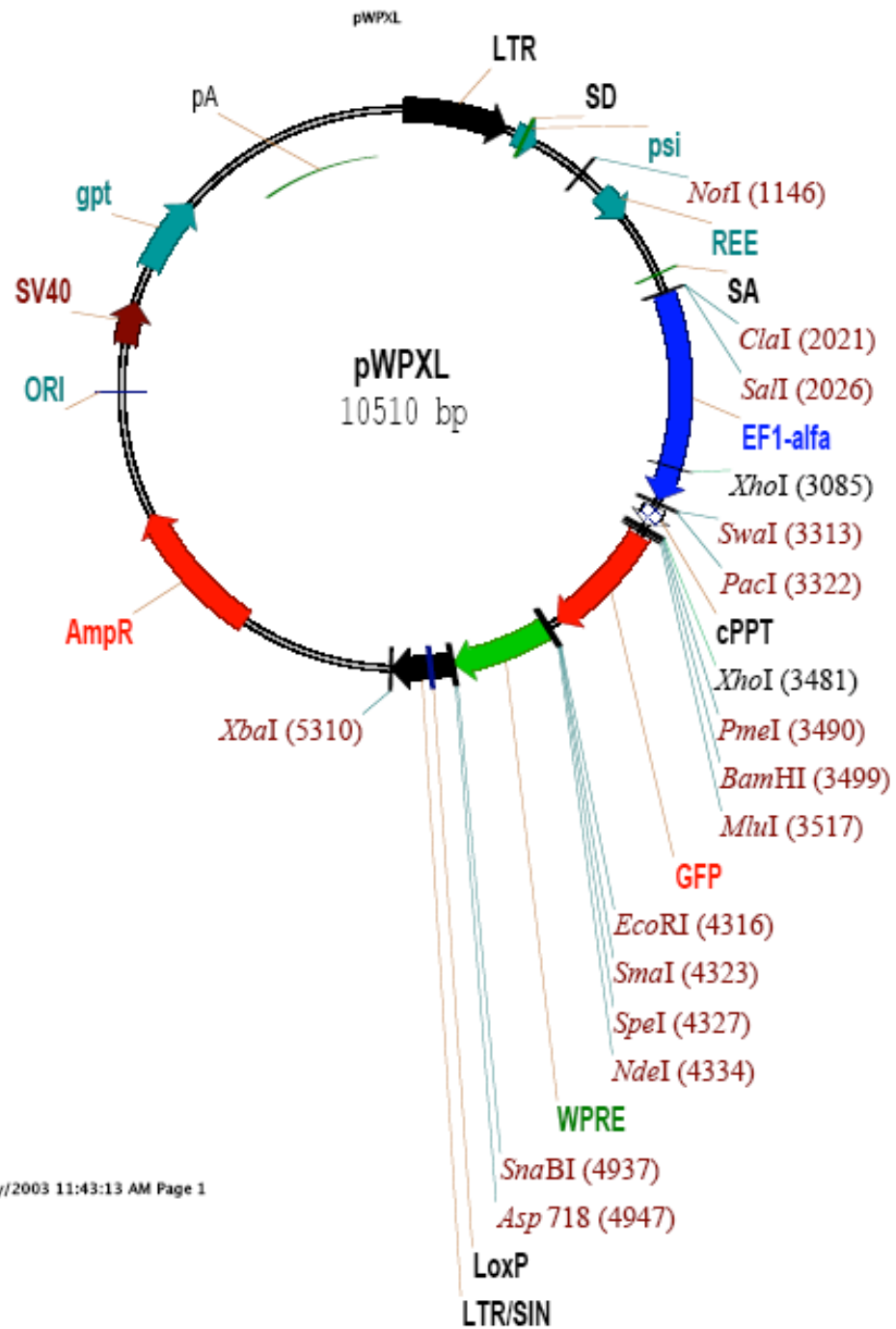
Élesztő rendszerek hátrányai

- az episomalis vektorok instabilak
- „túlcukrozás”
- a szekretált feh. megrekedhet a periplazmatikus térben
- Megoldás: más élesztő rendszer, rovar vagy emlős sejt kultúra

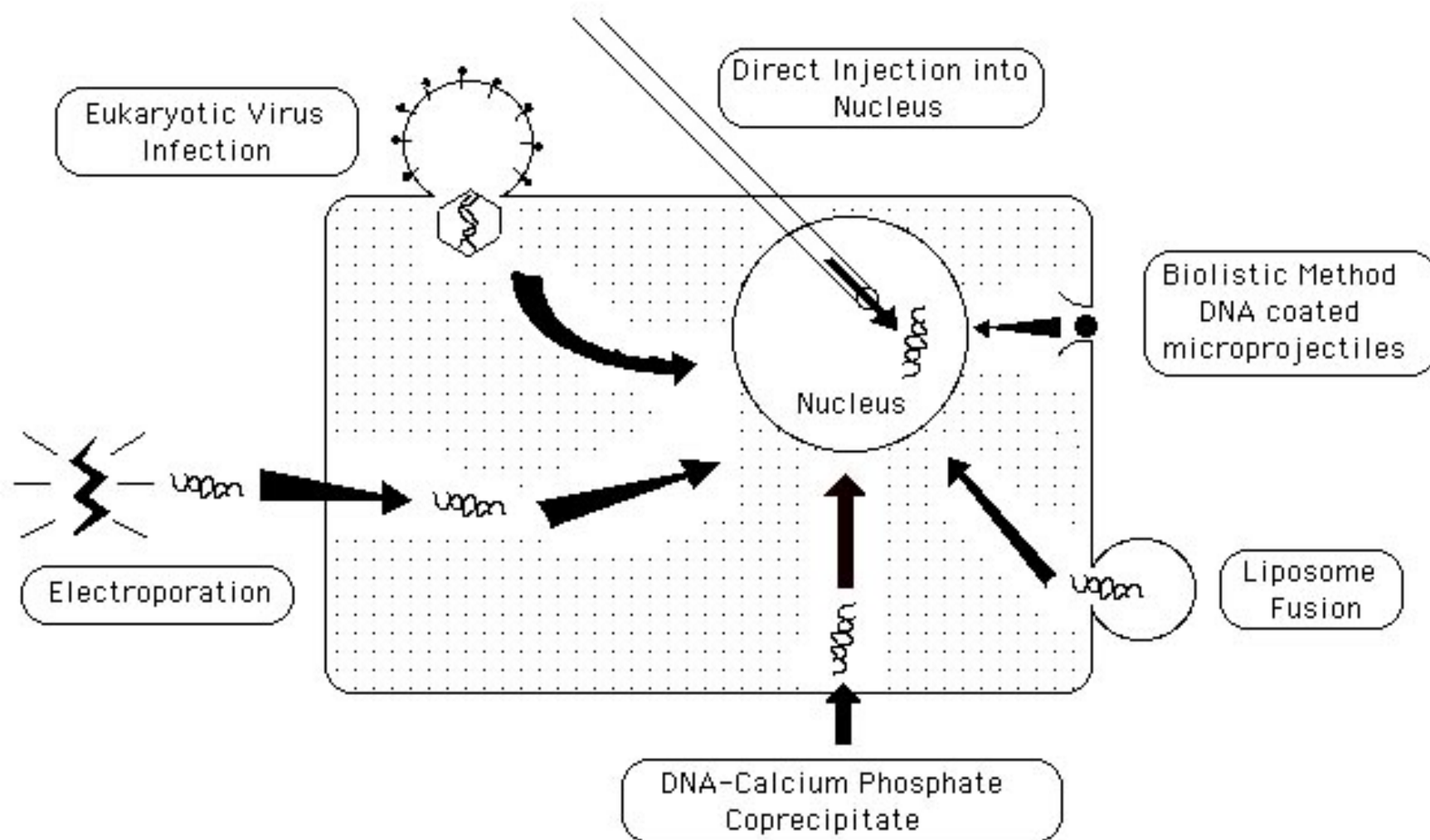
Eukarióta expressziós vektorok

- Replikációs origo – ált. vírus (SV40 eredetű)
- Promoter – vírusokból v. erősen expresszálódó emlős génekből (pl. CMV, SV40, HSV, EF-1)





Transzfekciós technikák





Eukarióta szelekciós markerek

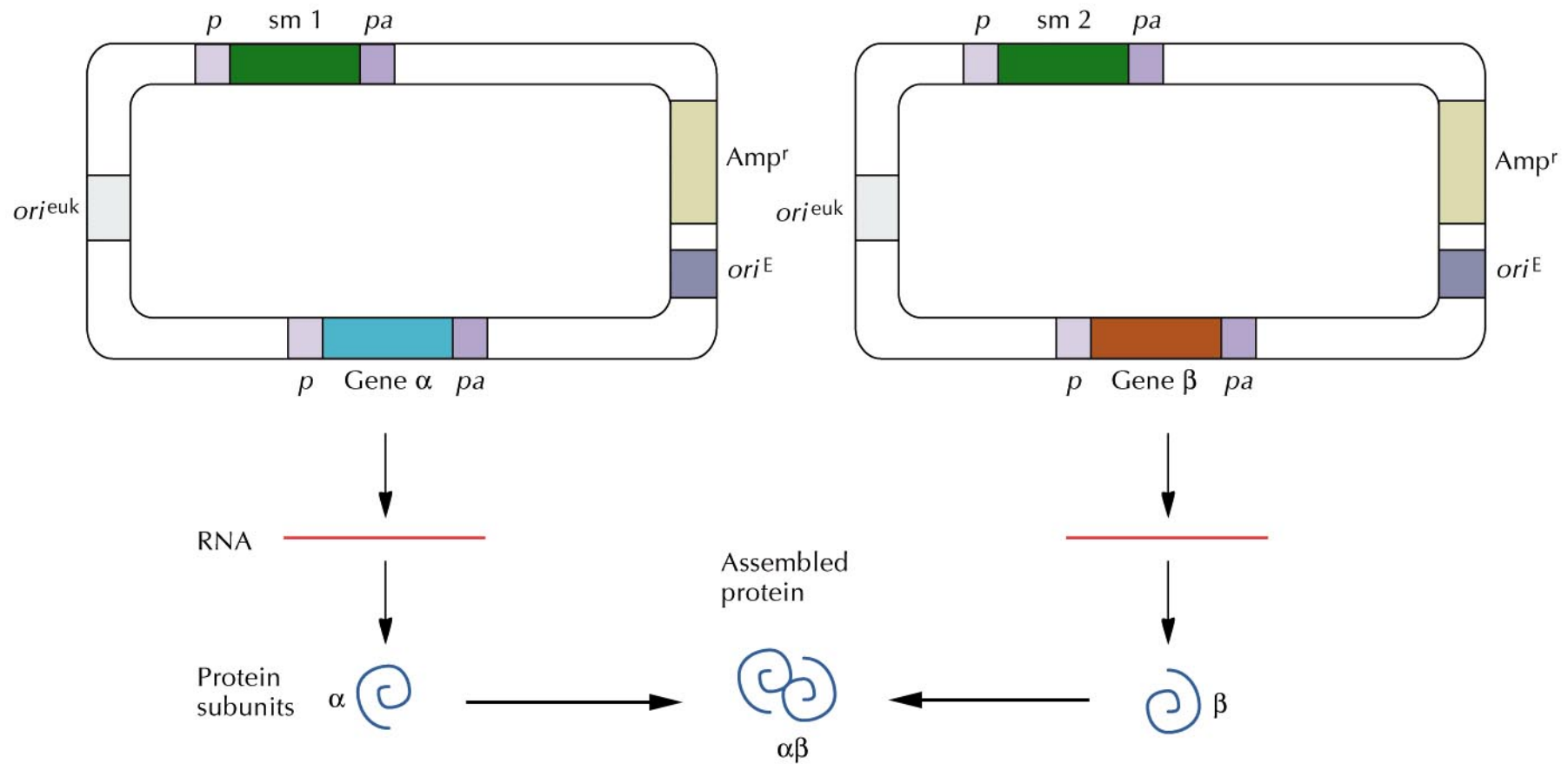
- **Metotrexát** – dihidrofolát-reduktáz enzim hiányos sejteket megöli
- **Metionin-szulfoximin** – glutamin-szintetáz (GS) enzim rezisztenssé teszi a sejteket
- **G418 (Geneticin)** – neomycin-foszfotranszferáz rezisztenssé (Neo^r) teszi a sejteket



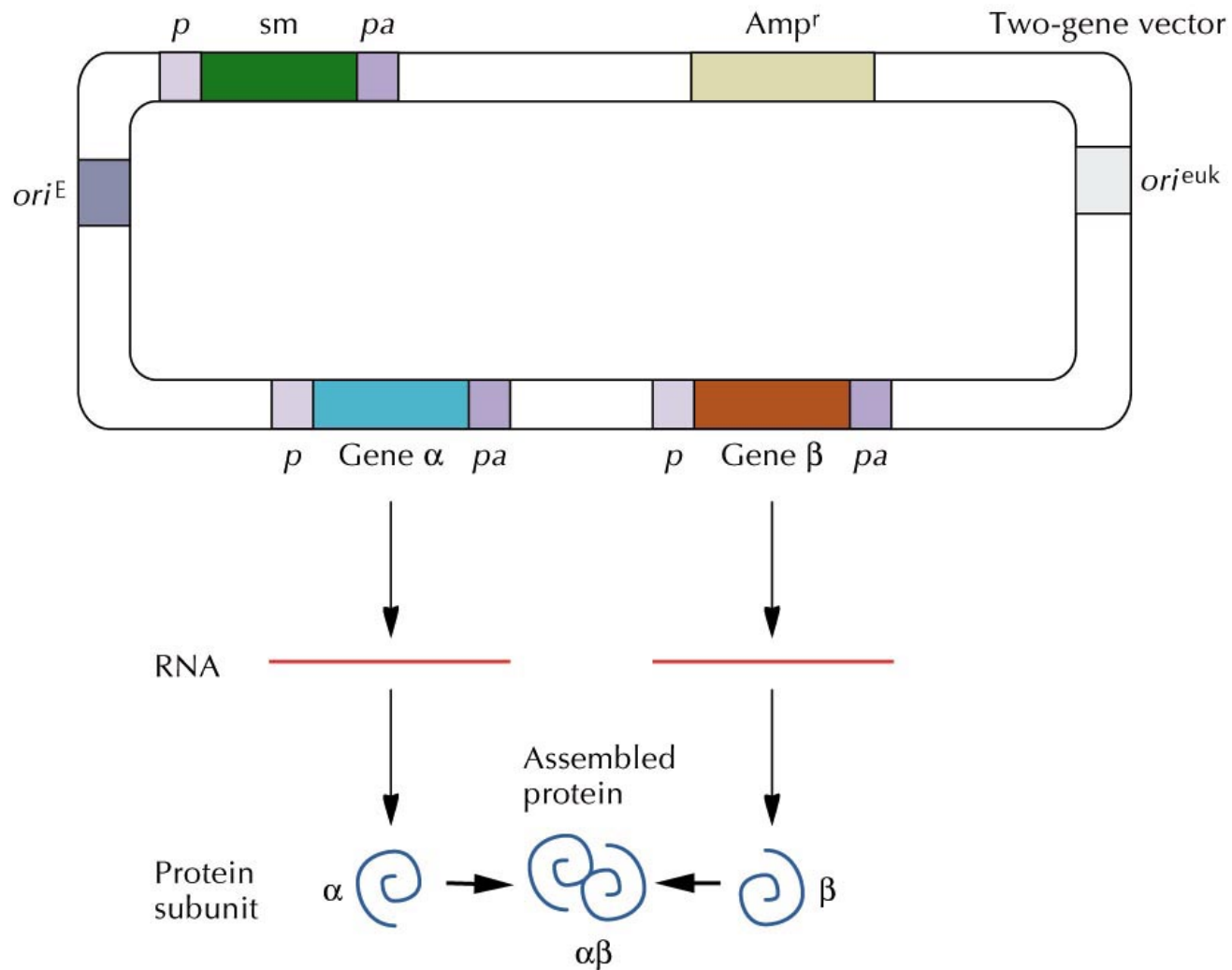
Több alegységből álló fehérjék expressziója

- 2 vektoros expressziós rendszer**
- 2 génes expressziós vektor (2 kazettás)**
- Bicisztronos vektor**

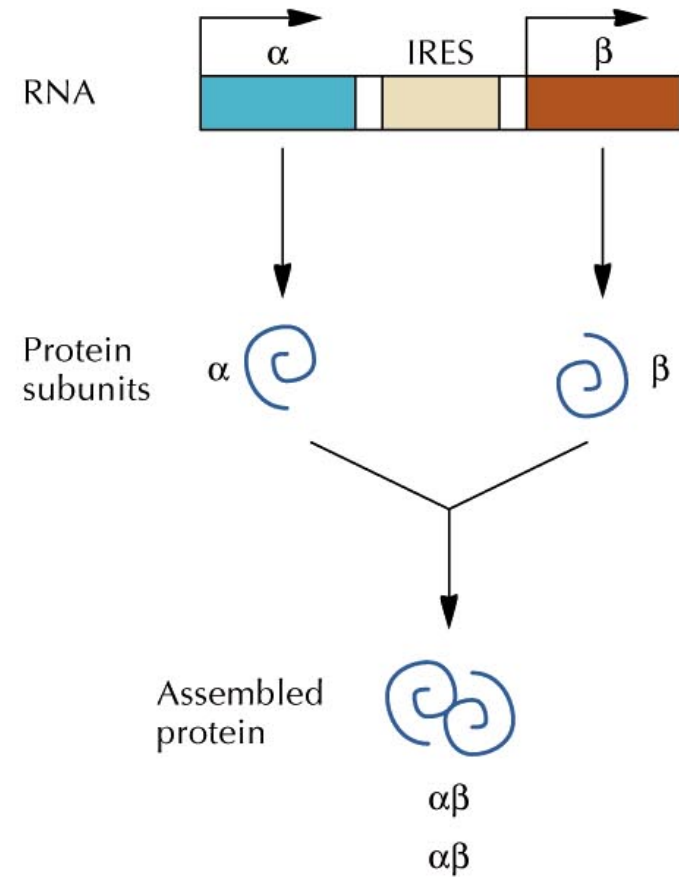
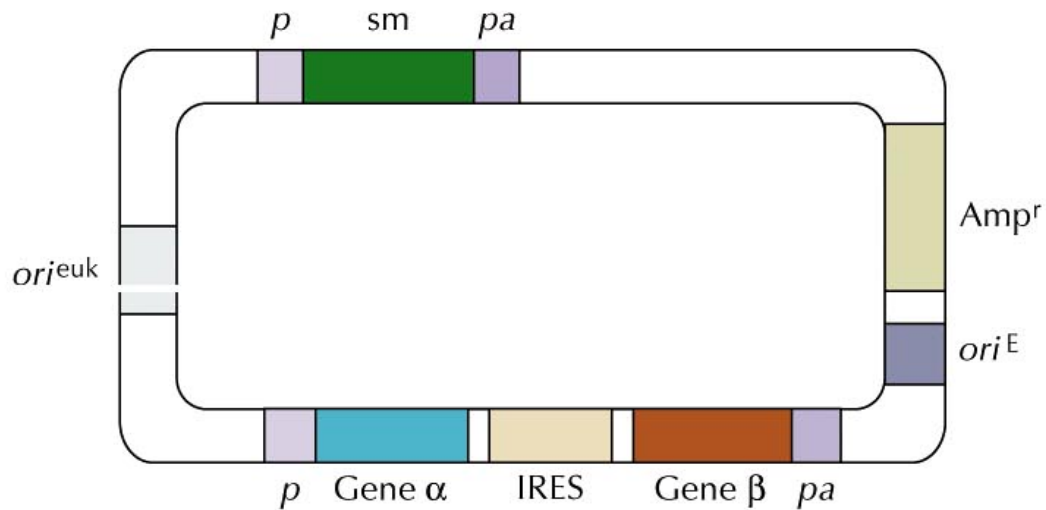
2 vektoros expressziós rendszer



2 génes expressziós vektor (2 kazettás)



Bicisztronos vektor





Néhány a gyakorlatban is használt rekombináns fehérje

VACCINES

- Hepatitis B virus surface antigen
- Malaria circumsporozoite protein
- HIV-1 envelope protein

DIAGNOSTICS

- Hepatitis C virus protein
- HIV-1 antigens

HUMAN THERAPEUTIC AGENTS

- Epidermal growth factor
- Insulin
- Insulin-like growth factor
- Platelet-derived growth factor
- Proinsulin
- Fibroblast growth factor
- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- α_1 antitrypsin
- Blood coagulation factor XIIIa