

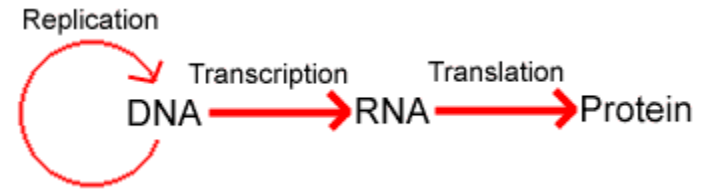
Ekspresijski sistemi

Kriteriji za izbor sistema

Prokariotski ekspresijski sistemi

- vektorji
- fuzije
- optimizacija proizvodnje
- topnost, stabilnost, renaturacija

# Izražanje genov



Izražanje gena v obliki proteina.

Potreben je učinkovit proces transkripcije in translacije.

ekspresija proteina (?)

Zakaj je potrebno pripravljati rekombinantne proteine?

- količine
- etika
- modifikacije
- postopki

# Izražanje genov / 2

Sistemi, ki so na voljo:

- prokariontski / evkariontski

- homologni / heterologni

← podobnost gostitelja glede na vir zapisa

razlike v: kompleksnosti procesov priprave in izvedbe, modifikacijah na površini proteina (posttranslacijske spremembe), ...ceni...

- Optimizacija izražanja je empiričen in dolgotrajen proces.
- Za izražanje potrebujemo primerne **vektorje** in **gostitelje**.
- Že na začetku moramo predvideti potrebne količine, načine detekcije in izolacije rekombinantnega proteina.
- Poznavanje lastnosti proteina bistveno pomaga pri izbiri ekspresijskega sistema.

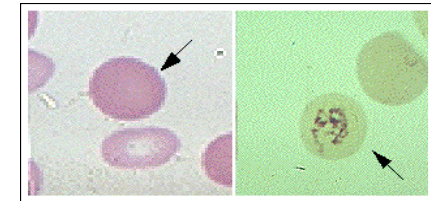
# Translacija *in vitro*

mRNA pretvorimo v protein v brezceličnem sistemu tako, da izkoristimo celične sestavine, ki so za sintezo potrebne.

Na voljo sta dva **translacijska sistema** za pripravo proteinov na osnovi mRNA:

**lizat zajčjih retikulocitov\*** in **lizat pšeničnih kalčkov**.

\* *retikulociti: nezreli eritrociti*



Polychrom.  
Erythrocyte

Reticulocyte  
(special Stain)

Celice lizirajo in obdelajo z mikrokokno nukleazo, s čimer razgradijo endogeno mRNA; ostanejo vse komponente, potrebne za translacijo (tRNA, ribosomi, aminokisliline, translacijski faktorji).

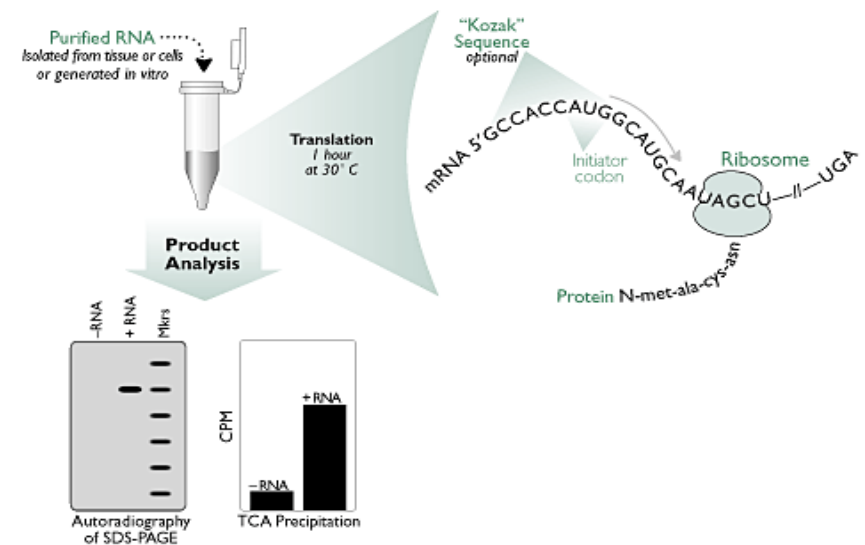
Pridobimo lahko le majhne količine proteinov, tako da rabimo občutljive načine detekcije: encimski testi, specifična protitelesa, radioaktivnost (*podobno kot pulse-chase*).

Potrebujemo:

2-6  $\mu\text{g}$  mRNA,  $\sim 15 \mu\text{l}$  lizata

(+ radioakt. Met)

reakcija teče 30 min pri  $30^\circ\text{C}$ .



# Transkripcija/translacija *in vitro*

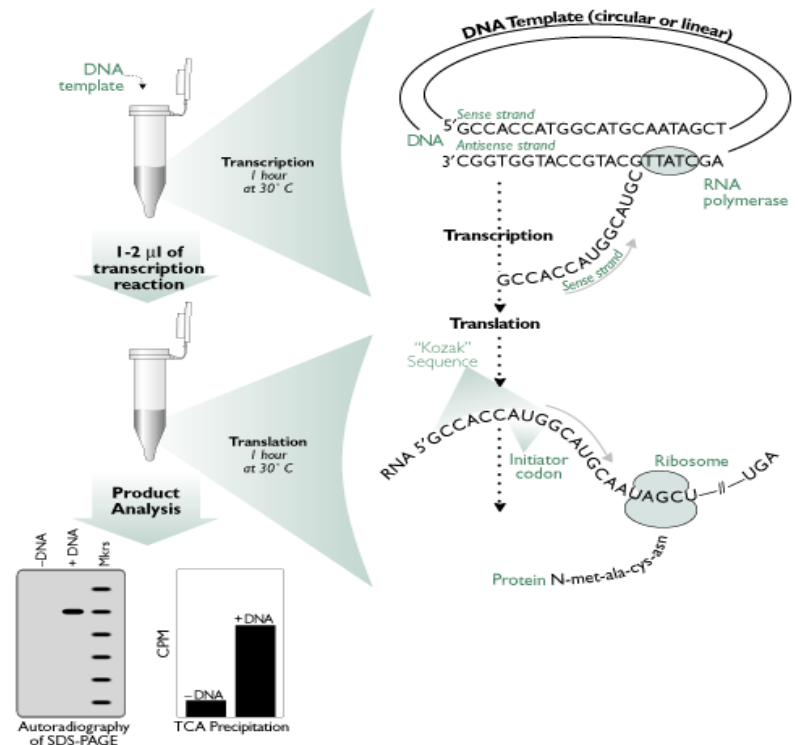
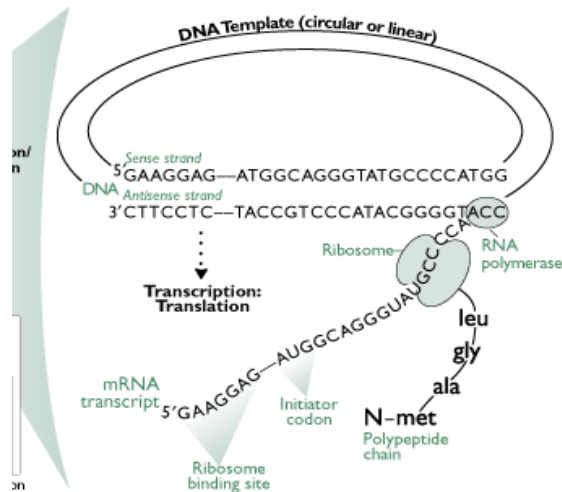
Če nimamo na voljo mRNA, lahko uporabimo **transkripcijsko-translacijske** sisteme: vključujejo **evkariontski ribosomski sistem + fagno ali prokariontsko RNA-polimerazo**.

Rabimo 0,2 µg - 2 µg DNA + ustrezen lizat (+radioakt. marker) in inkubiramo 2 h pri 30 °C.

Kot DNA lahko uporabimo samo kodirajoče zaporedje, ki smo mu dodali fagne promotorje (s PCR ali preko vektorja), lahko pa celoten plazmid ali fag.

Obstajata **evkariontski** in **prokariontski** transkripcijsko-translacijski sistem.

Pri prokariontskem gre za povezan proces, pri evkariontskem pa za dvostopenjski.



# Smerni in protismerni transkripti



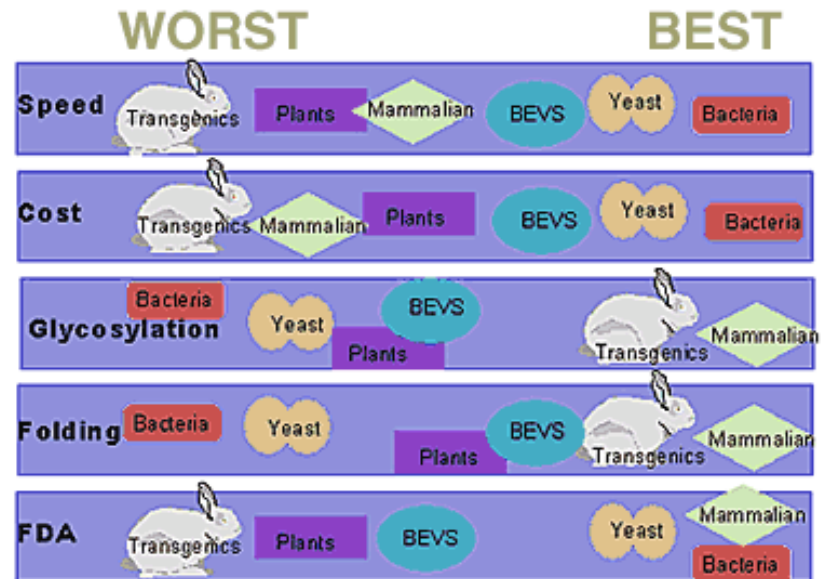
- promotor 1: smerna RNA → izražanje
- promotor 2: protismerna RNA → sonda

# Ekspresijski sistemi /1

sistem = gostitelj + ustrezní vektor

Najpogosteje uporabljeni gostitelji so:

- *E. coli*
- kvasovke
- insektne celice (bakulovirusni sistem)
- sesalske celice v kulturi



***E. coli***: enostavno, poceni, hitra rast, velik izbor vektorjev // težave z zvijem, ni posttranslacijskih modifikacij

**Kvasovke**: poceni, glikozilacija, pogosto izločajo protein v medij, nezahtevno gojenje v industrijskem merilu // težave s hiperglikozilacijo in neproteinskimi nečistočami

**Insektne in sesalske celice**: posttranslacijske modifikacije // cena gojišč in opreme, počasna rast, težje z velikimi volumni

# Ekspresijski sistemi /2

## Vektorji

- imajo različne **promotorske/terminatorske regije**
- imajo različno močna **mesta za vezavo ribosomov**
- imajo različno **število kopij/celico**
- lahko samo posredujejo pri **vklučevanju DNA v kromosom**
- (so)določajo **lokalizacijo** rekombinantnega proteina
- določajo **učinkovitost translacije**
- lahko vplivajo na **stabilnost** rekombinantnega proteina v celici



# Kriteriji za izbor

- ali obstaja sistem za čiščenje? → **ne**: fuzijski vektorji
- ali je protein stabilen ? → **ne**: sevi z manj proteazami
- ali so potrebne posttranslacijske modifikacije ? → **da**: evkariontski
- ali predstavlja gojišče resen strošek in oprema laboratorija pomanjkljiva ? →  
**da**: bakterije ali kvasovke
- ali je protein citotoksičen ? → **da**: regulacije ekspresije
- ali ima protein S-S ? → **da**: ekspresija v periplazmi ali zunaj celice
- ali potrebujemo velike količine ? → **da**:
  - skalabilni sistemi
  - močni promotorji

# Kriteriji za izbor /2

Splošni napotki za izbor sistema [Goeddel, 1990, Meth. Enzymol. 185]

tip proteina	lastnosti	ekspresijski sistem
mali proteini	do 80 aa	fuzijski proteini v <i>E. coli</i>
sekrecijski proteini	80-500 aa; encimi, citokini, hormoni	sekrecija ali direktna ekspresija v kateremkoli sistemu
zelo veliki proteini	>500 aa; sekrecijski ali površinski	sesalski sistemi
znotrajcelični proteini	>80 aa	sistem odvisen od namena raziskav

Rekombinantni proteini: namen dela [Goeddel, 1990, Meth. Enzymol. 185]

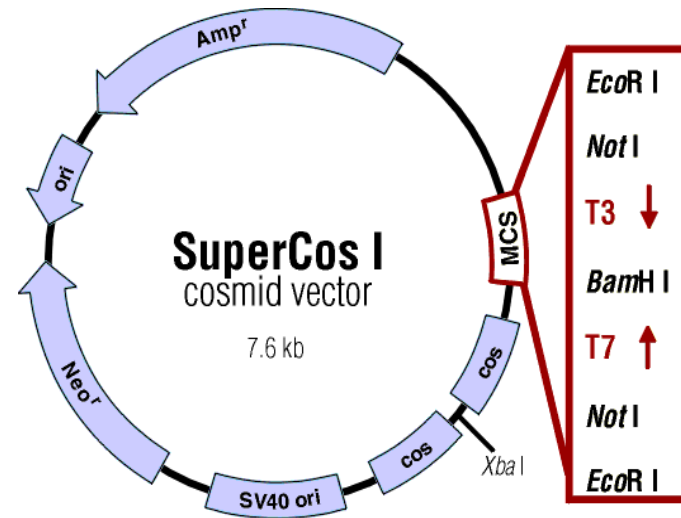
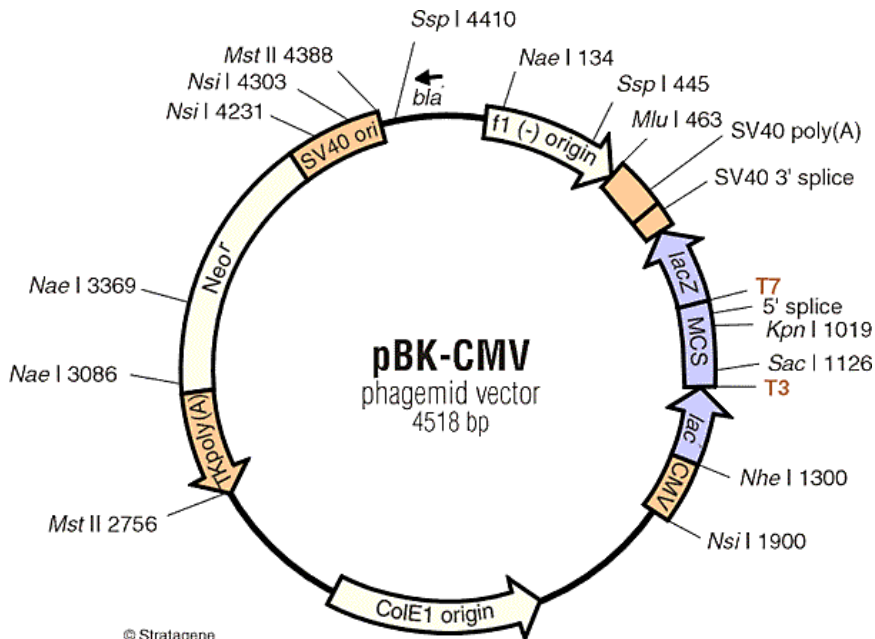
- potrditev identitete evkariontskega gena/cDNA preko funkcije → prehodno izražanje v sesalskih cel.
- potrditev identitete s protitelesi → izražanje v *E. coli*
- potrditev identitete DNA mikrobnega izvora → homologni sistemi
- priprava materiala za strukturne študije → preizkusi več sistemov
- priprava materiala za imunizacijo → *E. coli*
- priprava mutant za študij strukture/funkcije → *E. coli* ali alternativni sistemi

# Ekspresijski vektorji

posredujejo pri prenosu zapisa za želeni protein v gostiteljsko celico in vplivajo na način izražanja

prokariontski / evkariontski / dualni / prenosljivi (*shuttle*)

konstitutivni / inducibilni



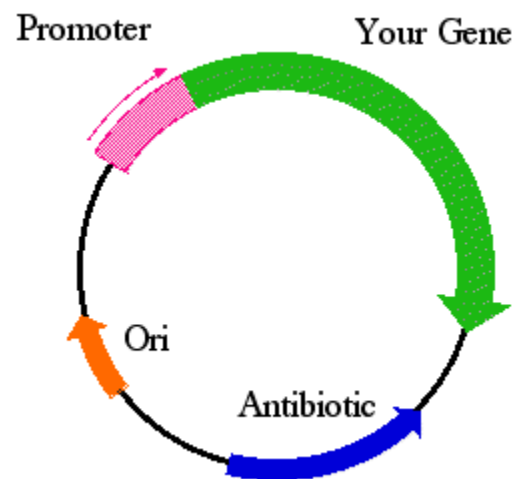
# Ekspresijski vektorji /2

## Minimalne zahteve za ekspresijski vektor:

- klonirno mesto
- *ori*, kompatibilen z gostiteljsko celico
- selekcijski marker
- promotor (če ga ni na insertu)
- mesto za vezavo ribosoma (če ni na insertu)

## Minimalne zahteve za insert:

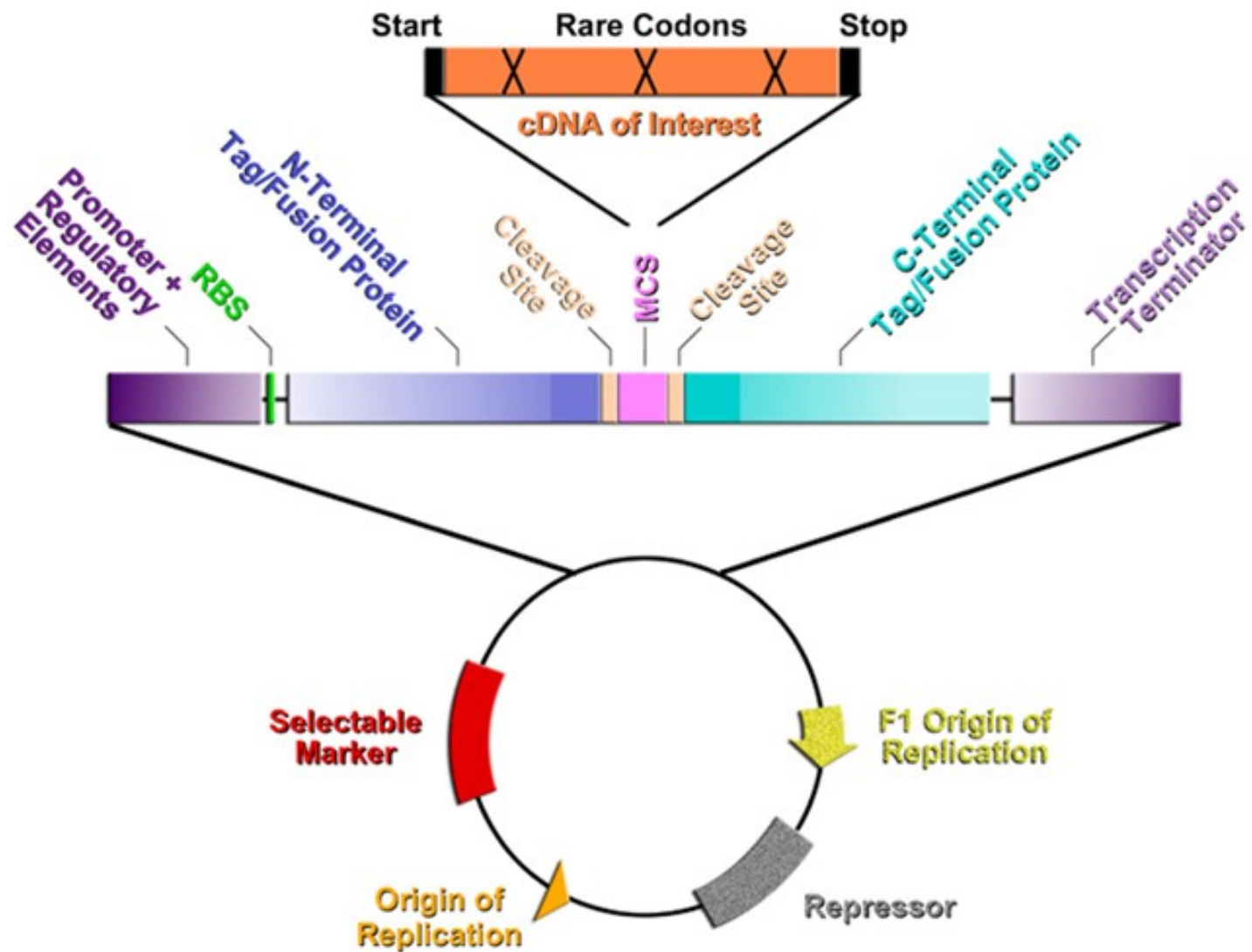
- klonirna mesta na obeh koncih (ali topi konci)
- kodona za start in stop (če nista na vektorju)



# Ekspresijski vektorji /3

Modifikacije vektorja / inserta:

- insert ima podvojen stop kodon ali stop kodone v 3 bralnih okvirih
- insert ima različni klonirni mesti na 5'- in 3'-koncu
- insert ima optimizirano rabo kodona (glede na gostitelja)
- vektor ima polilinkersko regijo - omogoča vnos preko različnih restrikcijskih mest
- vektor omogoča fenotipsko razlikovanje celic, ki imajo v vektor vključen insert
- več mest *ori* (prenosljivi vektorji)
- mesto *ori*, ki omogoča prisotnost večjega števila kopij vektorja v celici
- več selekcijskih markerjev (prenosljivi vektorji)
- promotorji s posebnimi lastnostmi: možnost uravnavanja izražanja (pri tem lahko sodelujejo zapisi na dodatnih vektorjih ali na gostiteljskem kromosomu)
- optimizirana razdalja med promotorjem / RBS / start
- vektor ima zapis za afinitetno ali reportersko oznako
- vektorji, ki posredujejo vgradnjo v kromosom, imajo homologne regije za rekombinacijo
- vektorji, ki usmerjajo produkt izven citoplazme, imajo ustrezna zaporedja (npr. signalna zaporedja - lahko na insertu)



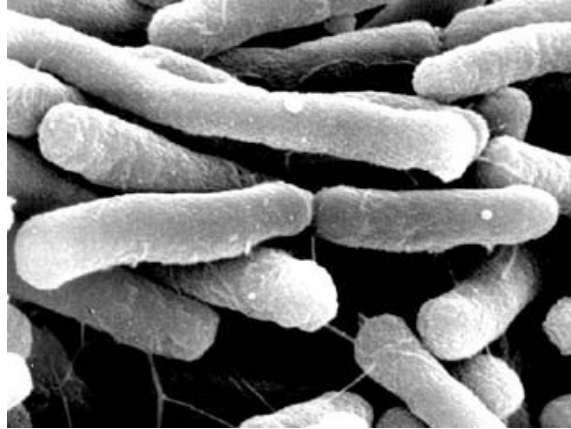
# Ekspresijski vektorji /4

## Problemi pri delu:

- težave pri kloniranju, uvedba mutacij, premik bralnega okvira
- citotoksičnost (zapisa ali) rekombinantnega proteina
- izgubljanje rekomb. ekspresijskega vektorja/zapisa iz kulture
- nizke ravni proizvodnje in/ali proteoliza
- nepravilno zvitje in agregacija
- težave pri čiščenju
- nizke aktivnosti rekombinantnih proteinov
- mutanti se obnašajo drugače kot izhodiščni protein

# Prokariontski ekspresijski sistemi

- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*



## ***E. coli*:**

najpogosteje uporabljan sistem, zelo veliko število vektorjev in sevov.

Izražanje je lahko **direktno** ali **fuzijsko**.

**Fuzijski sistemi:** **mini-fuzije** (signalna zaporedja → periplazma; oznake – npr. His6), **dolge fuzije** (celotne domene ali aktivni proteini – npr. GST).

**Izražanje v citoplazmi:** rekombinantni protein lahko predstavlja do ~30 % celotne količine proteinov, pogosto je netopen (reducirajoče okolje).

**Izražanje v periplazmi:** običajno do 0,2 % vseh proteinov, rekombinantni protein je topen.

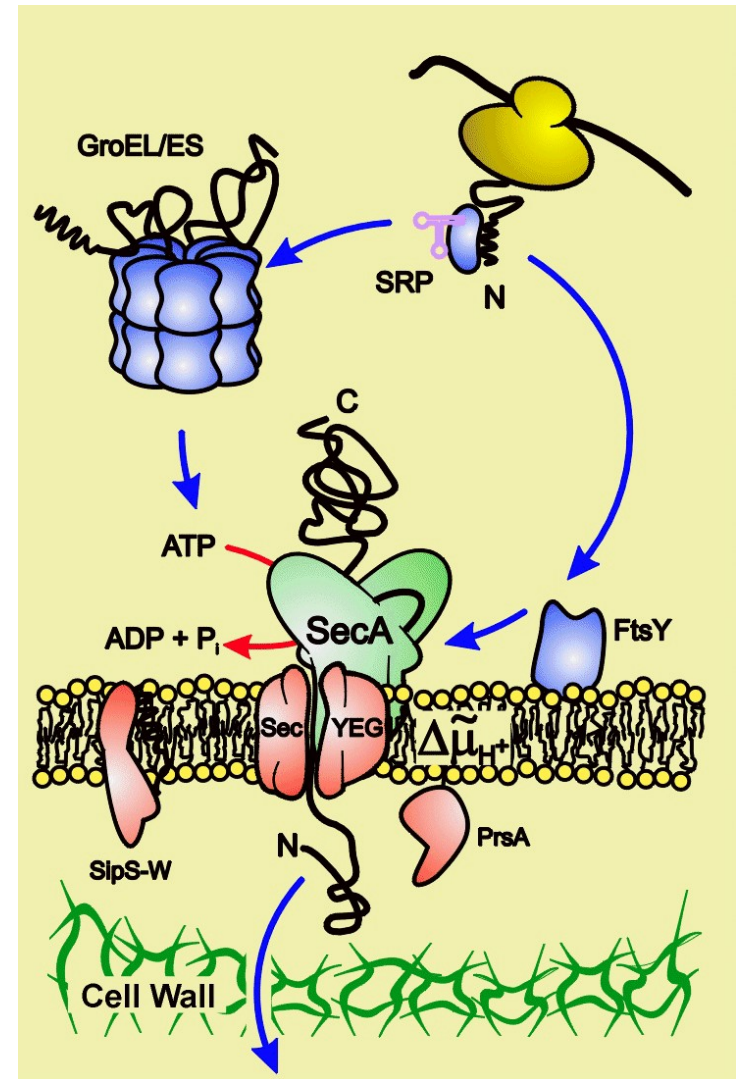
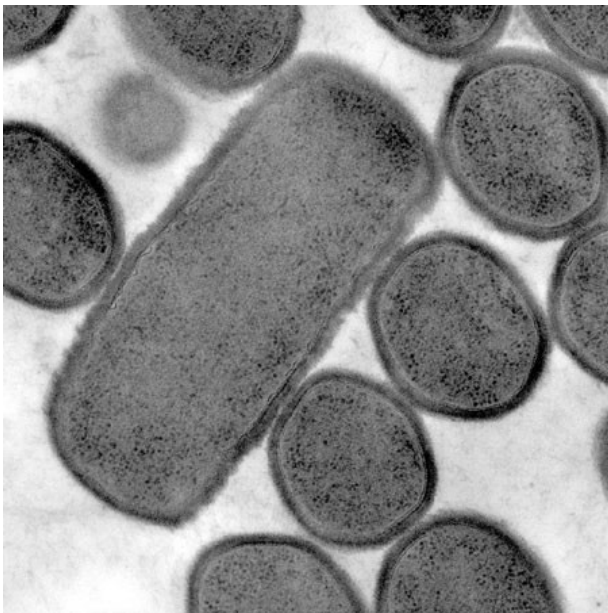


# Prokariontski ekspresijski sistemi /2

*B. subtilis* uporabljamo predvsem, kadar želimo pridobiti rekombinantni protein v gojišču.

Tako izraženi proteini so pogosto pravilno zviti in imajo S-S vezi na pravih mestih.

Problem: proteaze, stabilnost



# Promotorji za izražanje v *E. coli*

Večina vektorjev ima enega od standardnih promotorjev:

***P<sub>lac</sub>*** Omogoča regulacijo preko *lacI* (*lacI<sub>q</sub>* na vektorju ali kromosomu) – negativna regulacija; induciramo z IPTG (sintetični analog substrata). Pogosto uporabljamo varianto *P<sub>lacUV5</sub>*, ker je v tem primeru regulacija neodvisna od CAP.

***P<sub>trp</sub>*** Negativna regulacija preko *trpR* – indukcija preko odvzema triptofana iz medija (zato lahko izvajamo poskus v kateremkoli sevu). Ni uporabno, če ima rekombinantni protein veliko Trp.

***P<sub>tac</sub>*, *P<sub>trc</sub>*** Hibridna promotorja na osnovi *P<sub>lac</sub>* in *P<sub>trp</sub>*: regiji (-35) in (-10) sta vzeti od enega od obeh izvornih promotorjev, kombinacija pa zagotavlja, da je promotor močnejši. Indukcija z IPTG.

***P<sub>L</sub>*, *P<sub>R</sub>*** Izhajata iz bakteriofaga  $\lambda$ ; kontrola preko termolabilnega represorja *clts857* (na vektorju ali kromosomu); če ni *ts*, je lahko pod inducibilnim nadzorom (npr. preko Trp).

***P<sub>BAD</sub>*** Indukcija z arabinozo je odvisna od koncentracije induktorja.

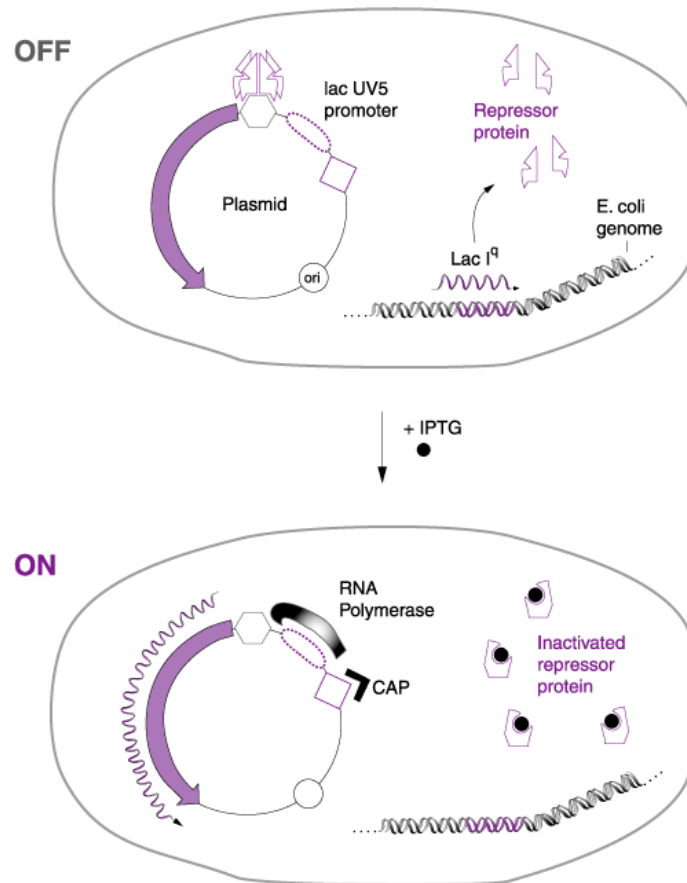
***P<sub>T7</sub>*** Zelo močan promotor; potrebuje RNA-polimerazo T7, ki je običajno kodirana na kromosomu (vnos preko profaga  $\lambda$ ). Regulacija najpogosteje preko *P<sub>lac</sub>*.

***P<sub>lpp</sub>*** konstitutivni promotor; v nekaterih verzijah izboljššan z vstavitvijo operatorja *lac*

***P<sub>T5</sub>*** močan fagni promotor, regulacija lahko preko operatorja *lac*

***P<sub>tetA</sub>*** indukcija z anhidrotetraciklinom v dozah, ki ne delujejo antibiotično

# Promotor/operator *lac*: indukcija



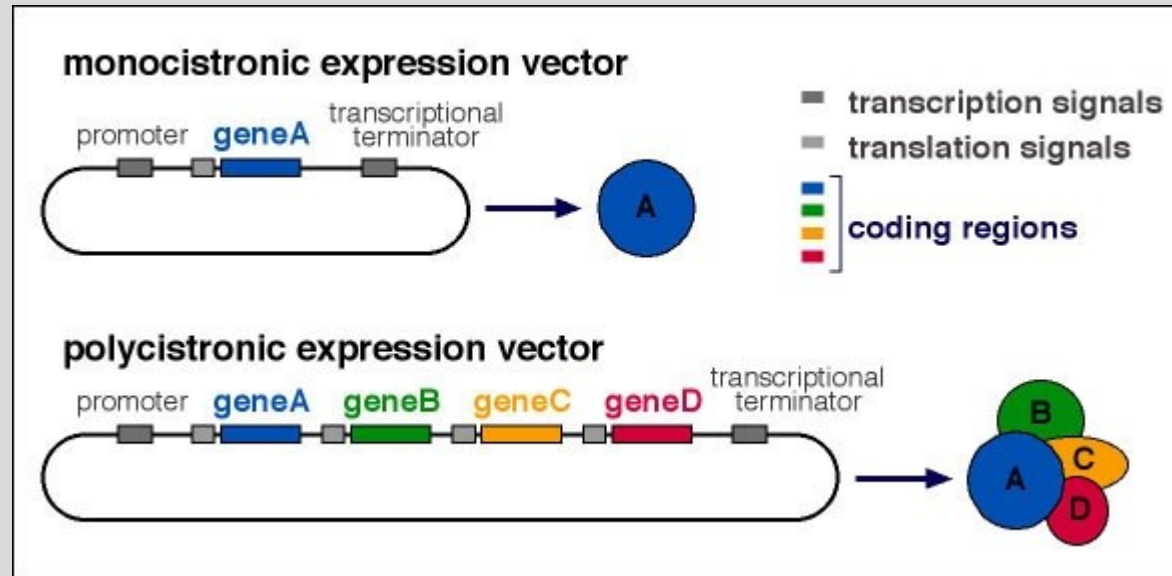
Problem: 'puščanje' promotorja – težko je doseči, da rekombinantni protein sploh ne bi nastajal.

Za boljšo regulacijo uporabljamo minimalna gojišča z glukozo ali uvedemo dodatno stopnjo kontrole (primer pri sistemu s promotorjem T7).

# Vrstni red dela - cilj: rekomb. protein

- študij podatkov o proteinu
- izbor vira zapisa (mRNA; klon)
- nakup ali priprava vira zapisa
- analiza zapisa (interna RE mesta)
- izbor ekspresijskega sistema
- shema kloniranja
- načrtovanje oligonukleotidov in naročilo
- dodajanje restrikcijskih mest, vnos v vektor in kloniranje
- kontrola nukleotidnega zaporedja
- prenos v ekspresijski vektor in kloniranje
- kontrola ravni izražanja in lokalizacija
- poskus čiščenja
- optimiziranje izražanja in/ali čiščenja
- izolacija večjih količin rekomb. proteina
- biokemijska analiza rekombinantnega proteina
- načrtovanje in izvedba mutageneze
- ...

# Mono- in policistronski konstrukti



# Fuzijski partnerji

Fuzijski partnerji predstavljajo elemente, zapisane na vektorju, ki se prevajajo in pomagajo pri detekciji ali čiščenju rekombinantnega proteina.

Lahko so na N- ali C- koncu proteina.

Odcep fuzijskega dela ni vedno mogoč.

Fuzijski partner omogoča (vsaj 1 od naštetega):

- prenos proteina skozi celično membrano (signalna zaporedja)
- detekcijo fuzijskega proteina s pomočjo (komercialnih) Ab, luminiscence, aktivnosti na substrate [reporterske fuzije]
- čiščenje fuzijskega proteina na afinitetnih nosilcih
- večjo topnost, stabilnost ali hitrejše zvitje proteina

bralni okvir se mora nadaljevati!

# Fuzijski partnerji

## Primeri fuzij:

signalna zaporedja: *ompA*, *pelB*

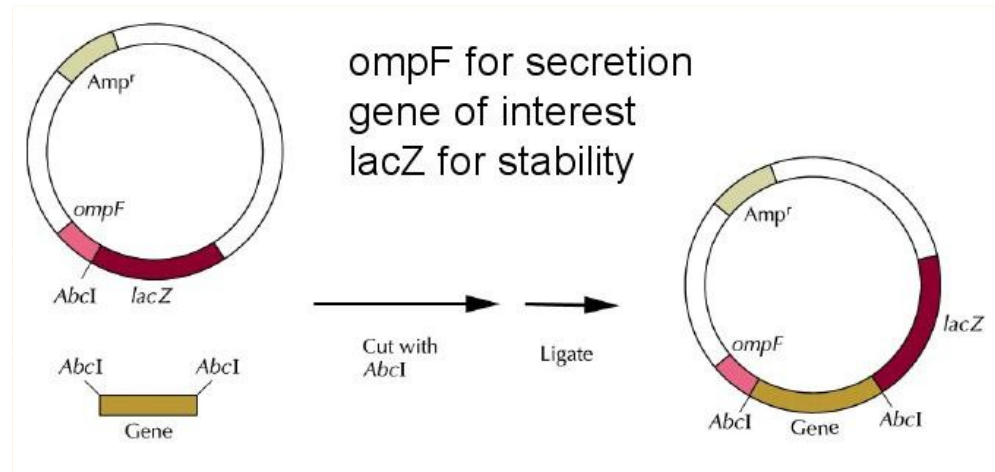
detekcija: GFP, S-tag, His-tag,  
FLAG, *c-myc*

čiščenje: GST, His-tag, MBP

stabilnost:  $\beta$ -*gal*

topnost: GST, MBP

zvitje: tioredoksin



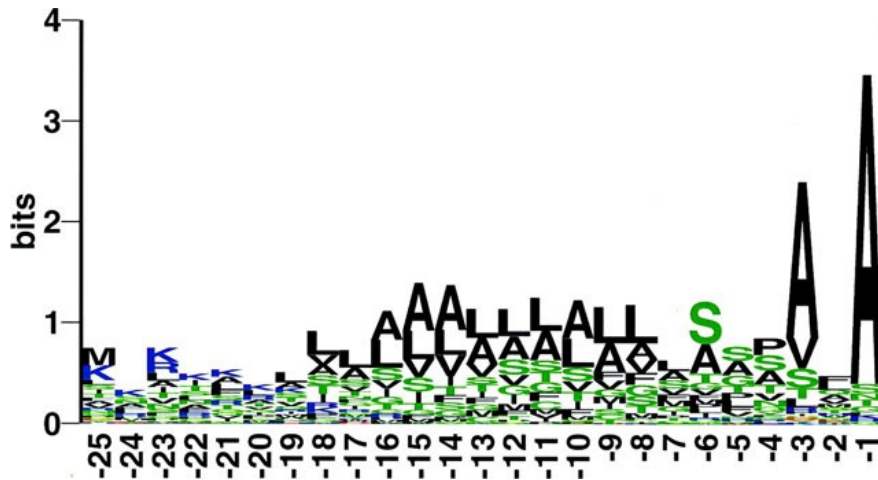
Nekateri vektorji omogočajo samo N- ali samo C- končno fuzijo, nekateri drugi pa katerokoli - izbrati moramo ustrezna mesta za kloniranje in paziti na stop-signal.

# Signalna zaporedja

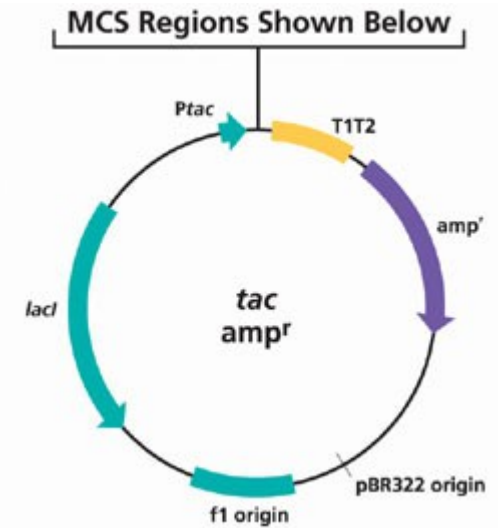
*ompA* ... 'outer membrane protein A' (*E. coli*)

*pelB* ... pektat-liaza (*Erwinia carotovora*)

*phoA* ... alkalna fosfataza (*E. coli*)



The EMBO Journal (1999) 18, 2982–2990



pFLAG-ATS (5.4 kb)





# Usmerjena lokalizacija - sekrecija

Zapis brez signalnega zaporedja se bo izrazil v **citoplazmi**.

Pri *E. coli* signalno zaporedje vodi protein v **periplazmo**.

Periplazma vsebuje <150 različnih proteinov in manj proteaz kot citoplazma. Izolacijo čiste periplazemske frakcije je težko doseči.

Izločanje v **gojišče** ima več prednosti: malo drugih proteinov → enostavno čiščenje; omogoča delo s kontinuirnimi kulturami; pravilno zaporedje na N-koncu; bolj oksidirajoče okolje - pravilno zvitje; ni proteaz.

Slabosti: nepopoln prehod v periplazmo, nizki izpleni, predvsem pri HMW-proteinih.

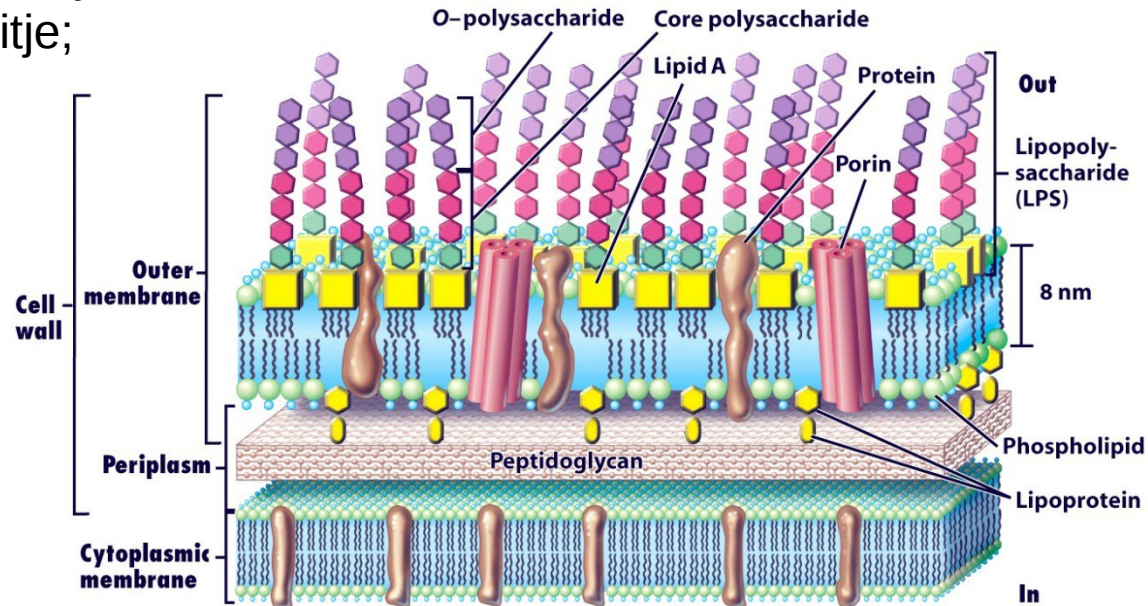


Figure 4-35a Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# Usmerjena lokalizacija – sekrecija /2

Signalni peptidazi sta dve:

Lep (SP I; Ala-X-Ala) in

Lsp (SP II; samo za lipoproteine);

delujeta na vse proteine, ki preidejo notranjo membrano. Sesalska signalna zaporedja večkrat delujejo tudi pri *E. coli*. Nekateri proteini imajo lastne sekrecijske poti (npr. enterotoksini, hemolizin), kolicin pa prehaja membrano zaradi delovanja pomožnega proteina direktno na fosfolipidno komponento membrane.

Izločanje **iz celice** je mogoče tudi pri *E. coli*:

- koekspresija BRP (protein, ki omogoča sproščanje bakteriocinov, npr. kolicina) ali drugih pomožnih proteinov
- obdelava celic z GdmHCl (0,4 M) + Triton X-100 (0,5 %): celična rast se ustavi, izloči se >75 % vseh proteinov v <1 h.

Nekateri LMW proteini, ki jih izrazimo v periplazmi, prehajajo zunanjo membrano in jih najdemo v gojišču.

Za prehod preko zunanje membrane je lahko potrebno še dodatno zaporedje, ki je običajno na C-koncu proteina.

# Fuzije z GST

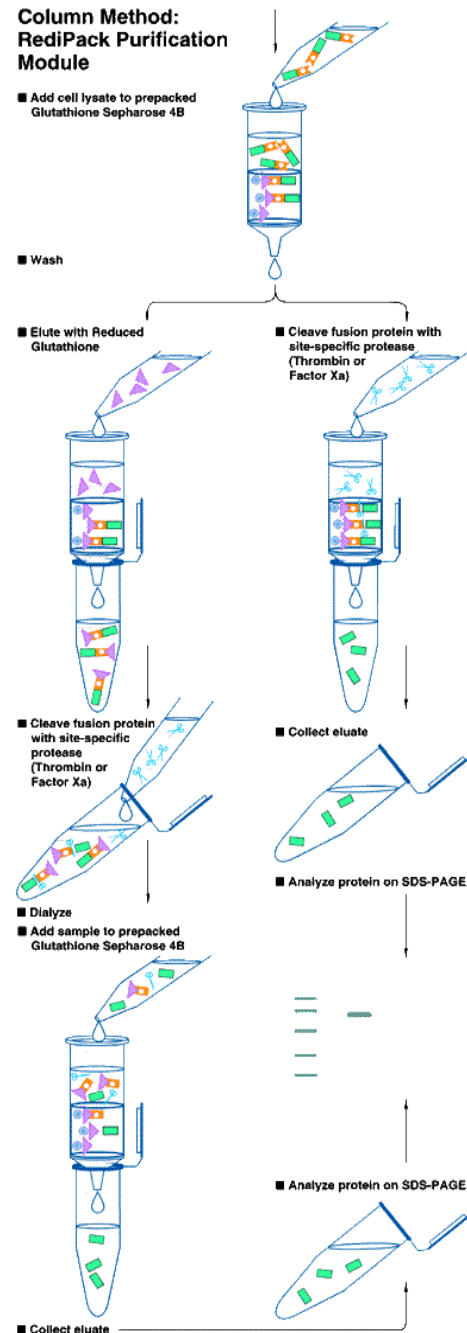


GST = glutation-S-transferaza

pri nekaterih vektorjih je možen odcep fuzijskega dela s trombinom ali F Xa (lahko na koloni)

vezava na imobilizirani glutation (preko C-10 ročice vezan na epoksi-aktivirano sefarozo)

eluiranje s prostim reduciranim glutationom



# Odcep fuzijskega dela

Fuzijski del, če je to predvideno, odcepimo kemično (npr. CNBr) ali s specifičnimi proteazami - prepoznavnega mesta ne sme biti v zaporedju rekomb. proteina!

Pri mini-fuzijah s signalnimi proteini deluje signalna peptidaza gostiteljske celice.

V ostalih primerih cepimo (delno) očiščen rekombinantni protein *in vitro*.

Uporabne proteaze so: enterokinaza, F Xa, trombin (več v sklopu B2)

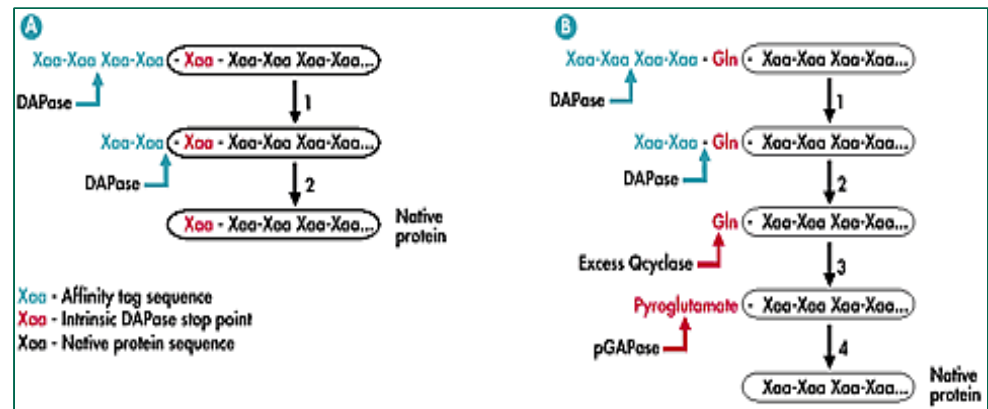
Alternativni odcepi:

proteaza TEV (virus mozaika tobaka) Nla  
(EXXYXQ/S)

proteaza rinovirusa 3C  
(LEVLFG/GP)

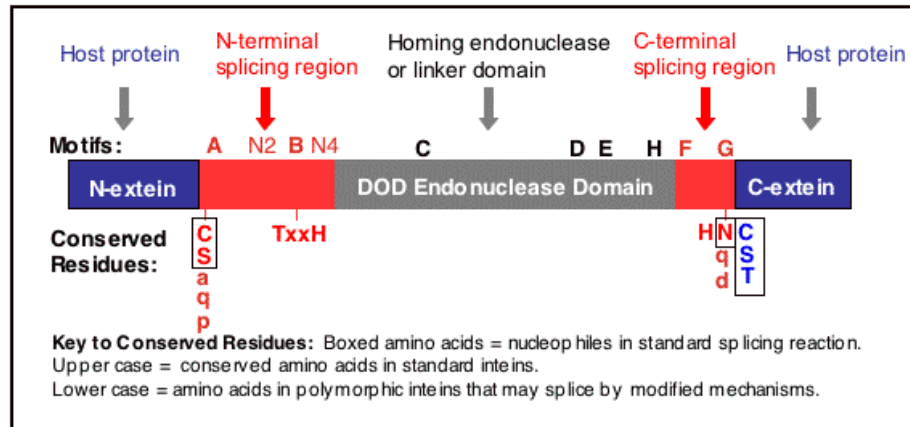
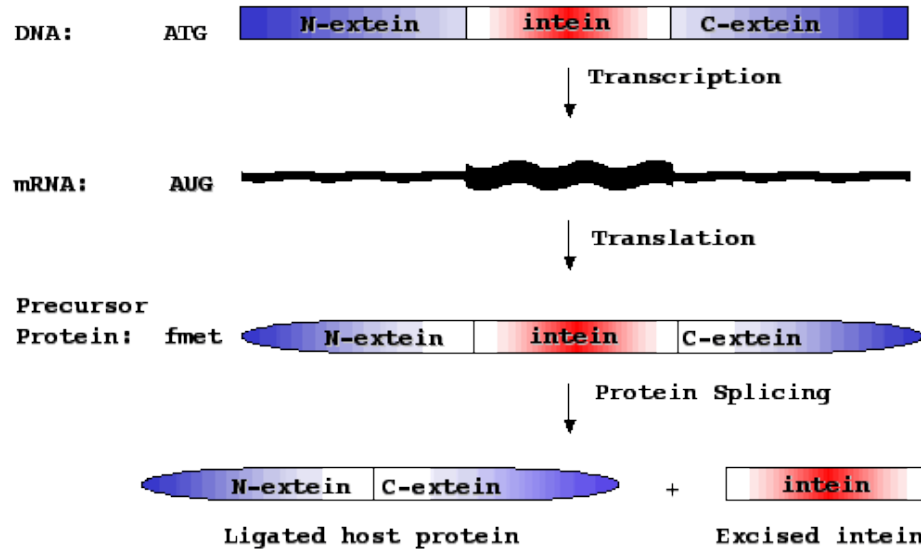
sistem TAGZyme / katepsin C →

sistem IMPACT



Amino acid	DAPase stop point (↓) sequence*
Lysine (Lys, K)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Lys-Xaa ...
Arginine (Arg, R)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Arg-Xaa ...
Proline (Pro, P)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Xaa-Xaa Pro-Xaa...
Proline (Pro, P)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Xaa-Pro Xaa-Xaa...
Glutamine (Gln, Q)†	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Gln-Xaa...

# Odcep fuzijskega dela: inteini

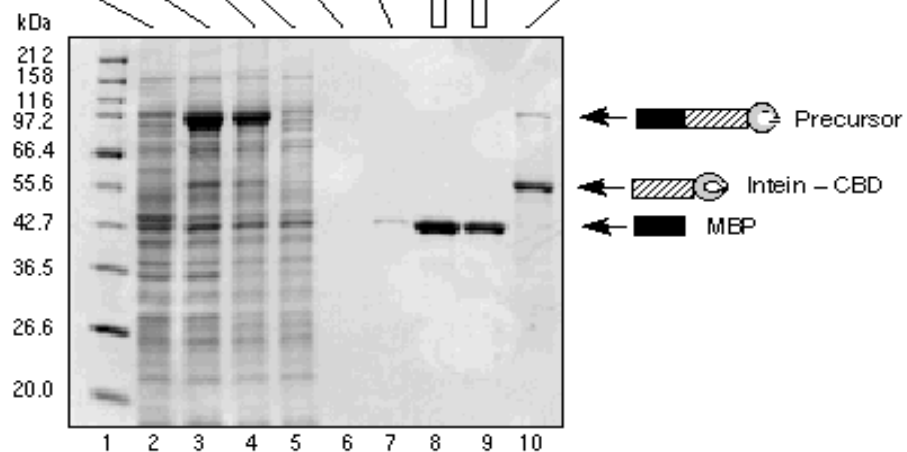
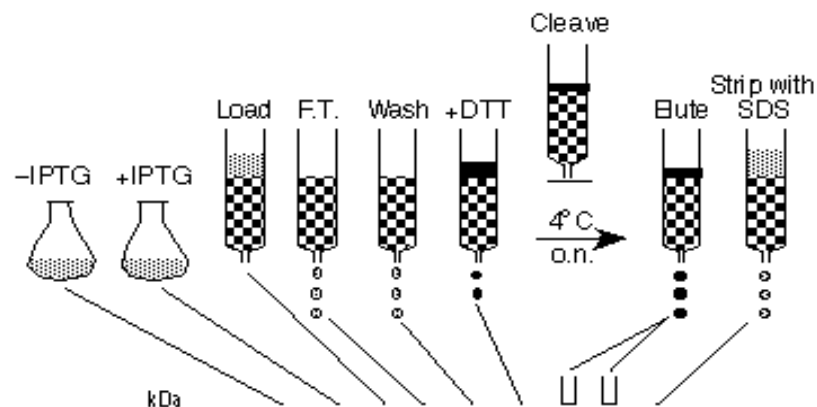
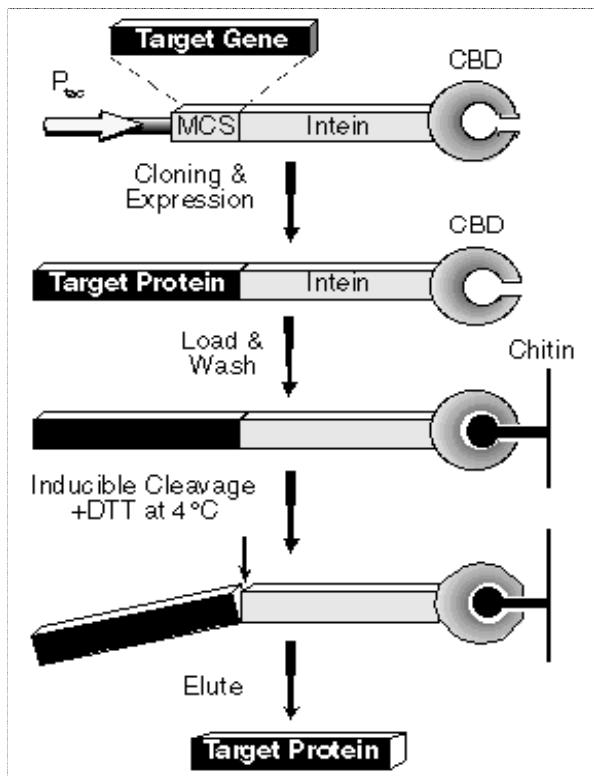


# Odcep fuzijskega dela: inteini /2

Sistem IMPACT (New England BioLabs)

CBD-intein + DTT → cepitev

čiščenje preko imobiliziranega hitina  
(CBD=chitin-binding domain)



# Izražanje s posredovanjem PT7

Vektorji pET (Novagen) 3-52 [F.W.Studier, 1986]

Imajo promotor bakteriofaga T7 → transkripcija samo z RNA-polimerazo T7. Zapis je na kromosomu (sevi ...[DE3]) pod kontrolo PlacUV5 ali na pomožnem fagu ICE6.

osnovni vektor pET3:

varianete:

• dodatna kontrola preko Plac  
• signalno zaporedje (*ompT*, *peIB*)

• His-tag

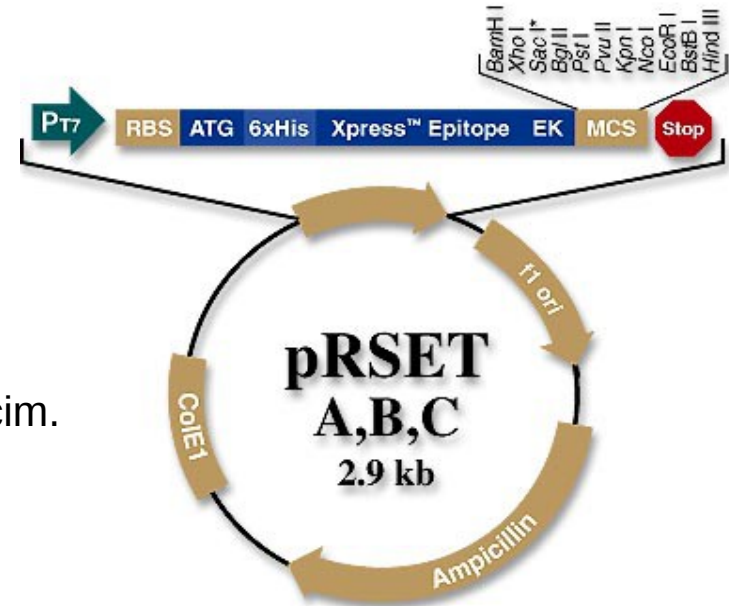
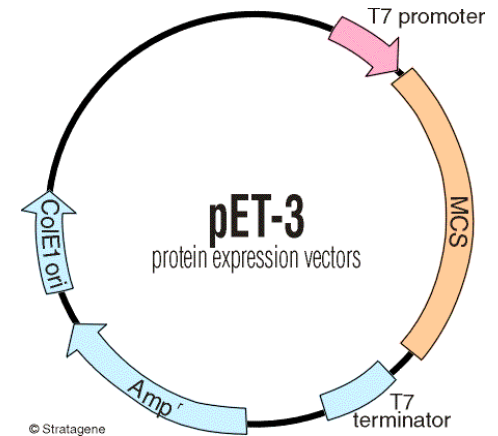
• odpornost proti kanamicinu

• mesta za odcep fuzijskega dela

• S-tag, Trx-tag, GST-tag

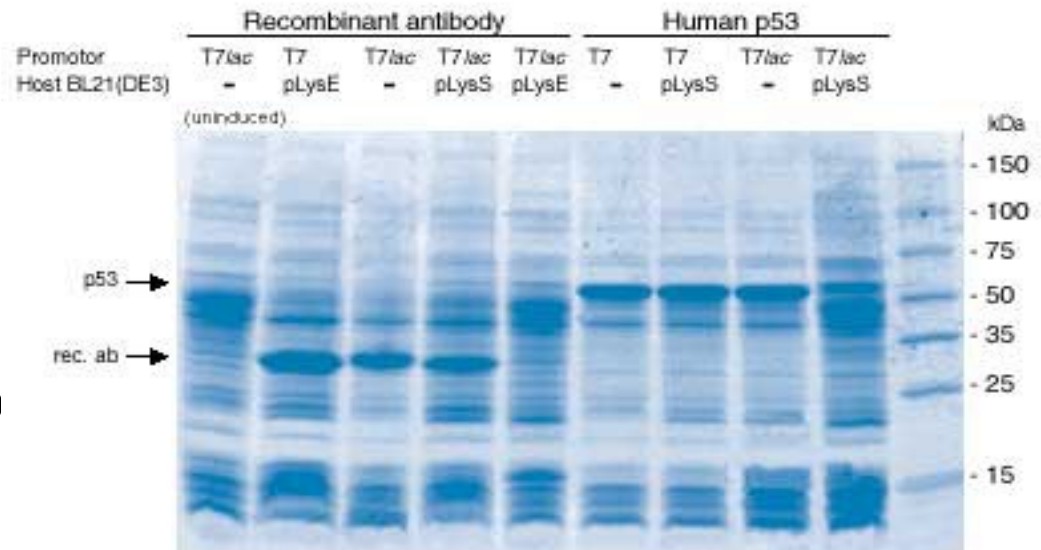
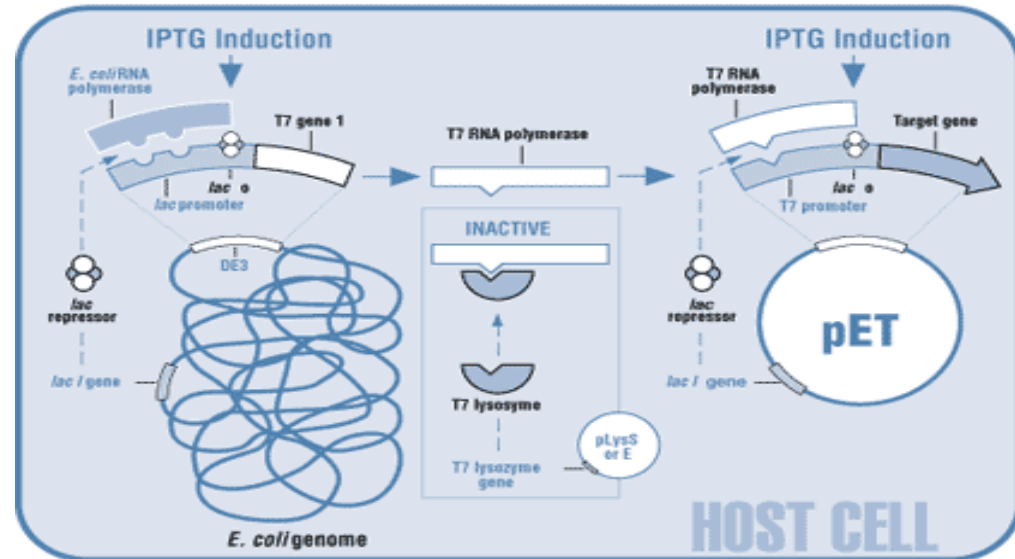
• 3 bralni okviri

Običajno uporabljamo sev *E. coli* BL21[DE3]; za boljšo regulacijo kotransformiramo s pLysS, ki kodira za T7-lizocim. Značilnosti: manj proteaz; težje transformirati kot K-12.



# Upravljanje izražanja (sistem T7)

Osnovni princip regulacije:

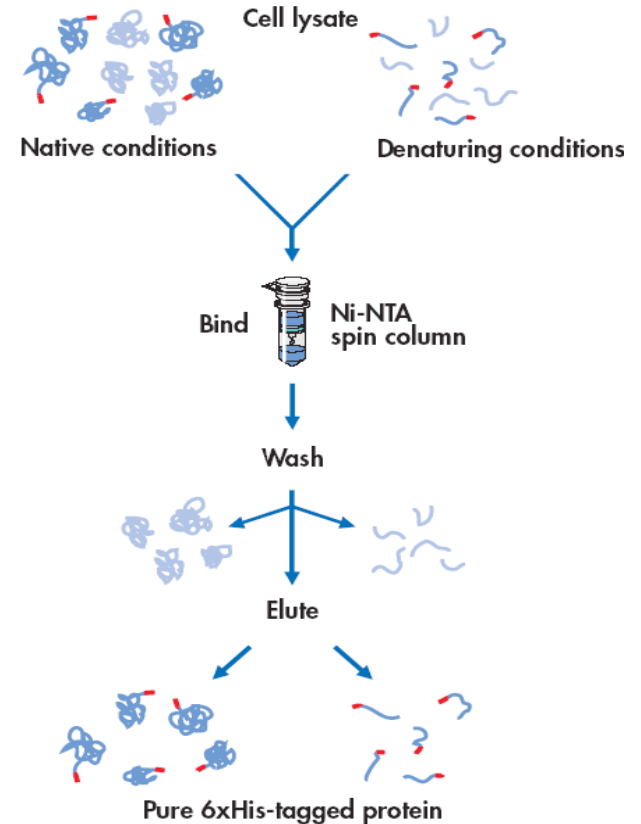
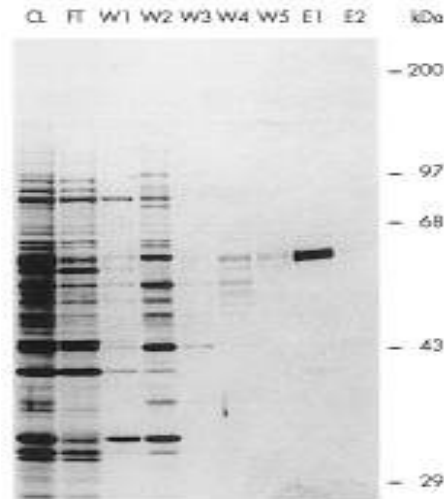
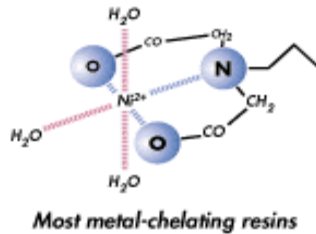


Celice gojimo do A550~0,7, nato dodamo IPTG in gojimo še ~4 h.



# Ni-kelatna kromatografija

Primer čiščenja na Ni-kelatnem nosilcu:



Stopnje dela:

- priprava nosilca (vezava Ni<sup>2+</sup>)
- vezava vzorca (brez reducentov, EDTA,... pri pH >7)
- spiranje s pufrom brez imidazola
- spiranje z naraščajočo konc. imidazola
- eluiranje z 0,1 M -1,0 M imidazolom
- regeneriranje kolone ali odcep Ni<sup>2+</sup> z EDTA

Optimizacija: priprava kolone s Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>; oblika gradienta...

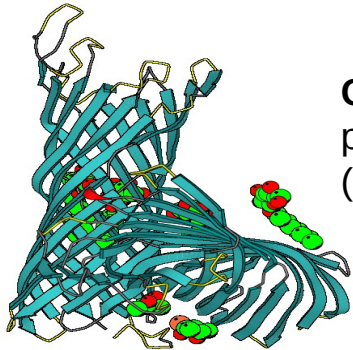
IMAC = *immobilized metal ion affinity chromatography*

# Proteoliza pri *E. coli*

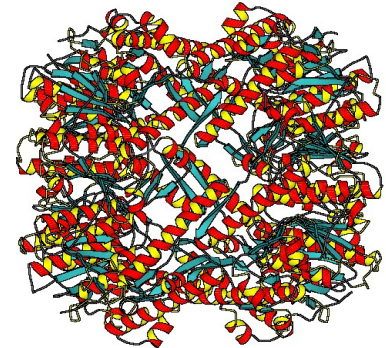
Pri *E. coli* je znanih 73 različnih proteaz (v glavnem metalo- (33), pa tudi Ser- (21), Cys-, Thr- in Asp-); večina jih je v citoplazmi (39), manj pa v periplazmi ali eni od obeh membran. [<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/proteases/allproteases.html>]

**Lon** - poglavitna od ATP-odvisna Ser-proteaza pri *E. coli*; nespecifična, deluje predvsem na nepravilno zvite proteinske substrate v citoplazmi. 360 kDa, 4-mer, generira peptide s 5-20 aminokisl. ostanki. Mutante: dva glavna fenotipa - občutljivost na UV, mukoidnost

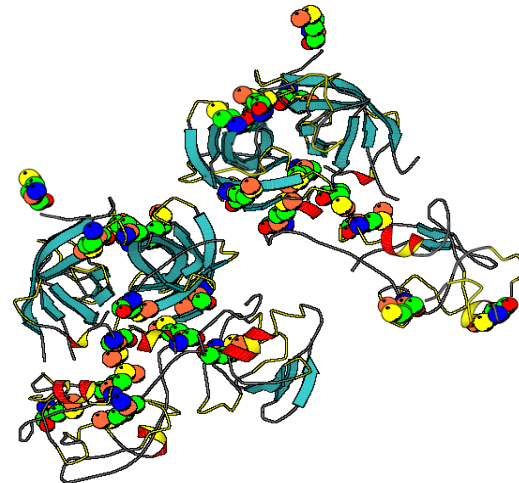
**Clp AP** - 750 kDa (6-mer ClpA: šaperon + 10-mer ClpP: Ser- proteaza), odvisna od ATP, generira fragmente z M~1500 Da  
(Cell **91**, 117-156, 1997)



**OmpT** - proteaza zunanje membrane, cepi ob paru bazičnih aminokislinskih ostankov  
(EMBO J. **20**, 5033-5039, 2001)



**DegP** = HtrA (Do) - periplazemska proteaza; lahko deluje na proteine, ki se izločajo iz celice. Pri normalni T je šaperon, pri višji T pa proteaza. (Nature **416**, 455 - 459, 2002)



# Proteoliza pri *E. coli* /2

Proteolizo lahko zmanjšamo z ukrepi na ravni:

- zapisa v vektorju,
- ekspresijskega sistema,
- pogojev gojenja,
- izolacijskega postopka.

Z uporabo **inhibitorjev** (koktajla) zmanjšamo proteolizo od faze razbijanja celic naprej.

Proteolizo ***in vivo*** lahko zmanjšamo, če rekombinantni protein pripravimo v katerem od sevov, ki imajo okvaro v sintezi ali regulaciji lastnih proteaz; npr. BL21 (lon-, ompT-).

## Na ravni zapisa:

- ▶ mutacija za proteolizo občutljivih mest,
- ▶ fuzija z dolgimi proteini,
- ▶ močni promotorji → nastajanje inkluzijskih telesc,
- ▶ usmerjanje v periplazmo.

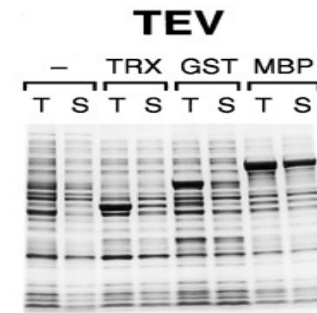
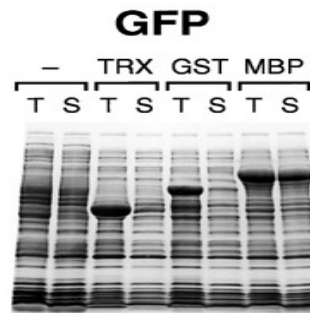
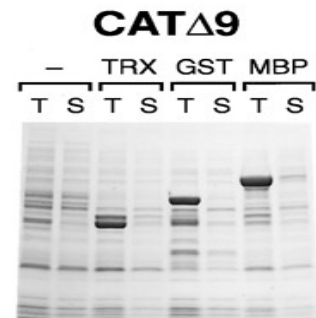
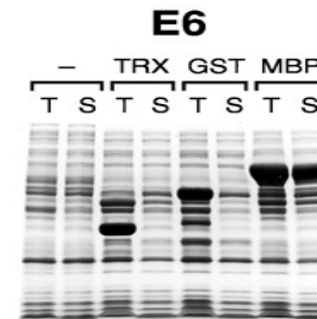
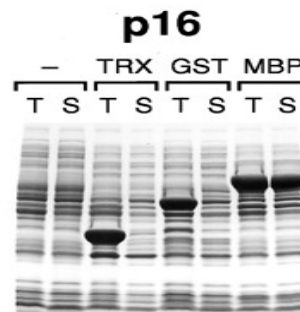
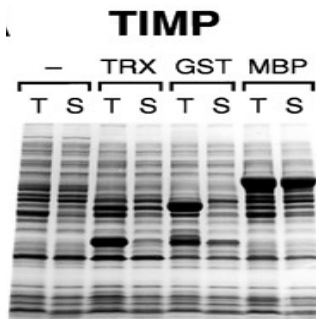
## Pomaga lahko tudi **gojenje**:

- ▶ pri nižjih temperaturah,
- ▶ pri nižjem pH (vpliva samo na ompT),
- ▶ v prisotnosti nizkomolekularnih inhibitorjev v gojišču,
- ▶ v bogatih gojiščih.

# Topnost

Običajno si želimo rekombinantni protein pridobiti v topni obliki, če pa je produkt citotoksičen ali nestabilen, pa je smiselno, da ga pripravimo v netopni obliki.

Topnost proteina povečamo z uporabo manj močnih promotorjev, gojenjem pri nižjih temperaturah, usmerjanju produkta izven citoplazme, vezavo proteina na fuzijske partnerje, ki povečajo topnost (npr. nusA - pET43, MBP) ali zagotavljajo učinkovitejše zvitje rekombinantnega proteina (GST, tioredoksin). Včasih pomaga zmanjšanje koncentracije induktorja, uporaba vektorja z manjšim številom kopij/celico in dodajanje aditivov (etanol, NaCl, saharoza) v gojišče.



# Inkluzijska telesa (IB)

netopni agregati v bakterijski citoplazmi  
sestavljani pretežno iz proteinov (rekomb. protein)

Prednosti:

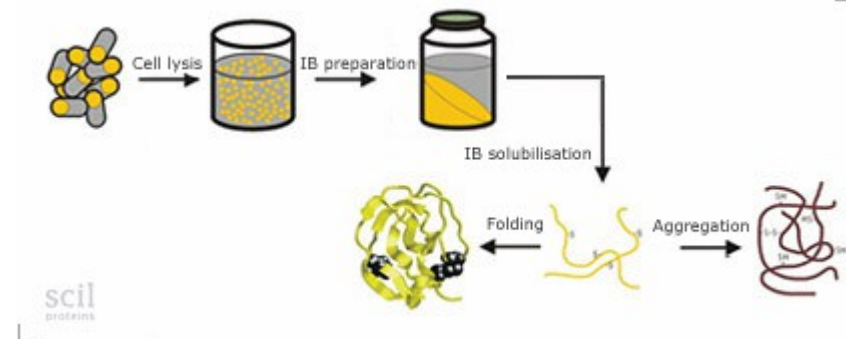
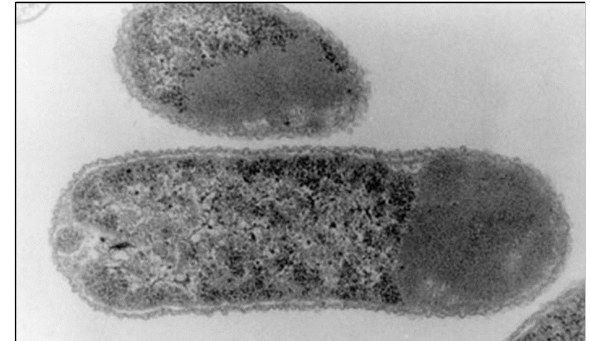
visoka koncentracija rekombinantnega proteina  
sprana IB predstavljajo >80 % čist rekomb. protein  $\Rightarrow$  preprosto čiščenje

Slabosti:

potrebno raztapljanje in renaturacija,  
saj je rekomb. protein napačno zvit

Postopek dela:

- 1.) razbitje celic in razgradnja DNA
- 2.) centrifugiranje: IB v usedlini
- 3.) spiranje s pufri (detergenti, soli; 3x), centrifugiranje
- 4.) IB raztopimo v 7M urei ali 6 M GdmHCl (+ reducent)
- 5.) renaturacija



# Renaturacija /1

- postopek, v katerem denaturiran protein zavzame nativno strukturo
- gre za kompetitiven proces med agregacijo in renaturacijo

Rekombinantni protein najprej v celoti denaturiramo. Proteine z cisteinskimi ostanki (disulfidnimi vezmi) moramo tudi reducirati. V procesu renaturacije postopno odvezemamo denaturant (in reducent), ob tem pa protein preide v nativno konformacijo.

Osnovne tehnike renaturacije:

- dializa
- redčenje
- uporaba ionskega izmenjevalca
- uporaba imobiliziranega afinitetnega liganda



Protein ima med renaturacijo (dializa, redčenje) večinoma koncentracijo  $<50 \mu\text{g/ml}$  → manj intermolekularnih interakcij.

Pogosto dodajamo snovi, ki povečajo stabilnost proteinov, okrepijo odbojne sile ali zmanjšujejo agregacijo (npr. detergenti, L-Arg, glicerol).

Za nastanek S-S je potreben redoks-par, npr. cistein/cistin, reducirani/oksidirani glutation.

# Renaturacija /2

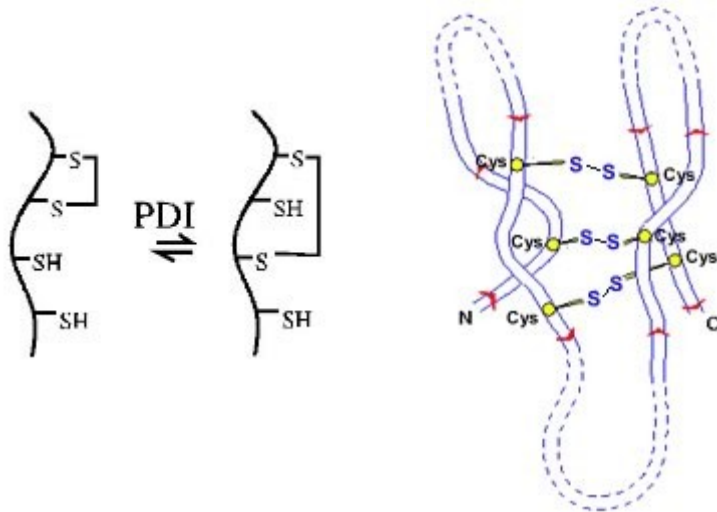
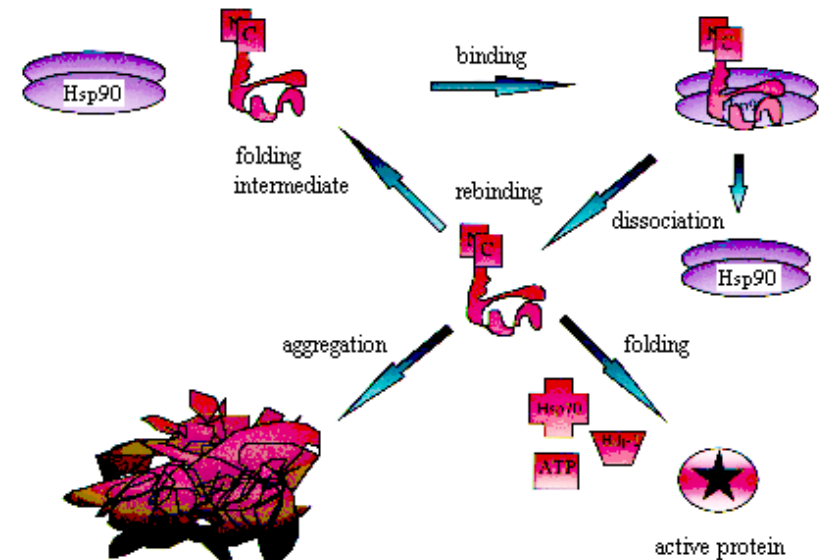
Po renaturaciji agregate odcentrifugiramo, supernatant pa skoncentriramo in preverimo biološko aktivnost proteina ter preverimo fizikalno-kemijske lastnosti.

Problemi: proteoliza, agregacija, odstranjevanje aditivov.

Izkoristek renaturacije je pogosto le nekaj odstotkov ali celo manj.

Obstajajo tudi metode, pri katerih dodajamo šaperone *in vitro* ali pa imamo zapis zanje na dodatnem vektorju že v celicah.

Fuzije z tioredoksinom naj bi pomagale pri preurejanju S-S.



# Optimizacija izražanja

pogoji gojenja

- trajanje indukcije
- temperatura (nižja T - manj nepravilnega zvitja)
- sestava gojišča (+glukoza - inaktivira Plac)

ekspresijski sev: različni sevi imajo lahko različne ravni izražanja

uvajanje dodatne kontrole transkripcije preko elementa na kromosomu ali dodatnem plazmidu (LysS, *lac*/T7-pol)

raba kodona - mutageneza ali uporaba sevov, ki proizvajajo tRNA za redke kodone

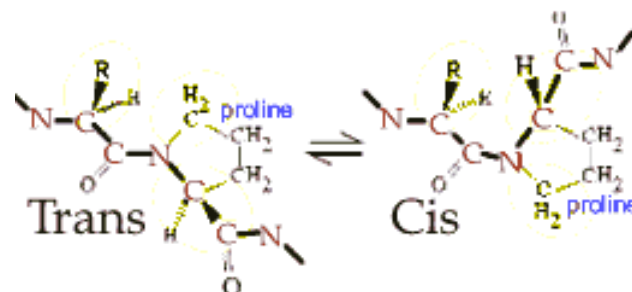
zmanjšanje proteolize v celici in med čiščenjem

zamenjava N-končne aminokisliline, ki odloča o t<sub>1/2</sub> posameznega proteina v celici (kritične so: Arg, Lys, Leu, Phe, Tyr, Trp)

usmerjanje produkta v periplazmo / gojišče / IB

priprava fuzijske oblike

koekspresija šaperona ali foldaze (disulfid-, protil-izomeraze)





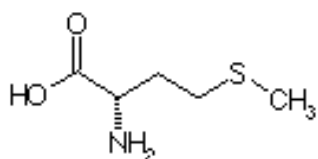
# Optimizacija /2

- sprememba konstrukta (npr. samo hidrofilne domene ali netoksični deli proteina)
- vektor z večjim številom kopij/celico
- pomnoževanje števila zapisov v vektorju

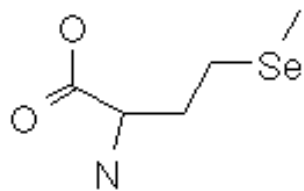
# zamenjava vektorja ali celotnega sistema

# optimizacija postopka čiščenja

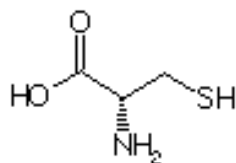
Modifikacije: vgrajevanje označenih AA (selenocistein, selenometionin, 15N)  
za strukturne študije.



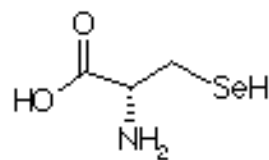
C00073



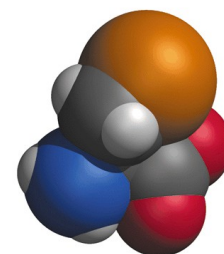
C05335



C00097



C02432



Selenocysteine

