

Inżynieria białek terapeutycznych

Peptydy i białka

Tworzenie i utrzymywanie struktury.

Kolagen.

History.

Transport.

Hemoglobina.

Prealbumin.

Kanały jonowe.

Ochrona i obrona.

IgG.

Kontrola i regulacja.

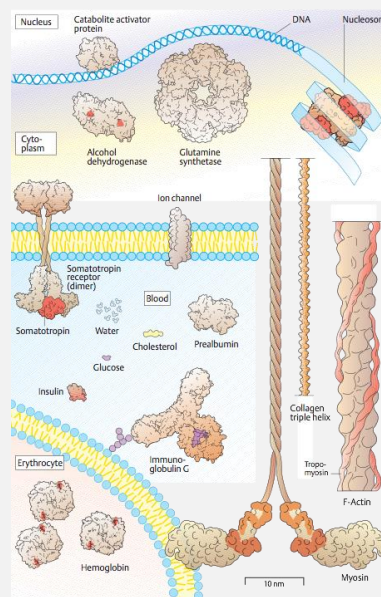
Hormony i ich receptory.

Kataboliczne aktywatory .

Kataliza.

Ruch.

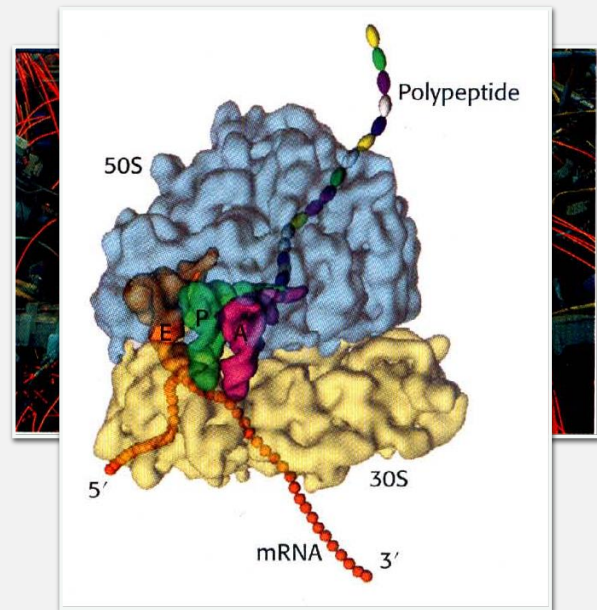
Filamenty aktynowe.



Szybkość procesu

Przepisanie DNA-mRNA to kopiowanie informacji 1:1.
Przepisanie mRNA-AA to tłumaczenie informacji na 'inny język'.

E. coli przeprowadza translację w tempie ok 40 aminokwasów na sekundę.



Dokładność procesu

DNA/RNA jest kodem zdegenerowanym.

AA posiadają fizykochemiczne cechy charakterystyczne i jedynie w niewielkim stopniu mogą się wzajemnie zastępować.

Częstość wprowadzania błędnego aminokwasu oscyluje wokół wartości 10^{-4} .

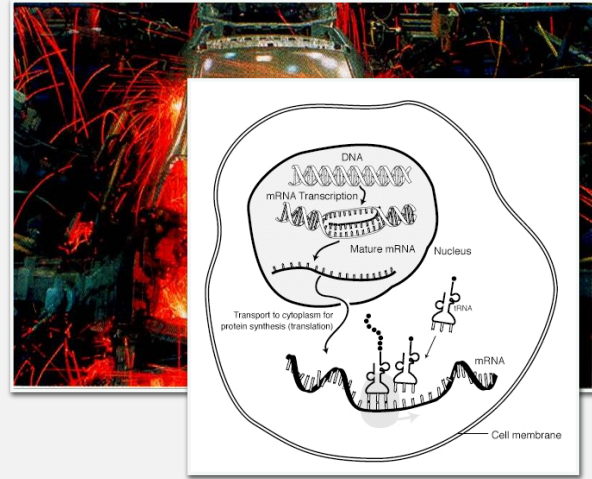
Frequency of inserting an incorrect amino acid	PROBABILITY OF SYNTHESIZING AN ERROR-FREE PROTEIN		
	NUMBER OF AMINO ACID RESIDUES		
	100	300	1000
10^{-2}	0.366	0.049	0.000
10^{-3}	0.905	0.741	0.368
10^{-4}	0.990	0.970	0.905
10^{-5}	0.999	0.997	0.990
10^{-2}	0.000	0.000	0.000
10^{-4}	0.000	0.000	0.000
10^{-4}	0.000	0.000	0.000
10^{-4}	0.000	0.000	0.000

Transportujący RNA (tRNA)

mRNA, matrycowy (informacyjny, przekaznikowy) RNA - rodzaj RNA, którego funkcją jest przenoszenie informacji genetycznej o sekwencji poszczególnych polipeptydów z genów do aparatu translacyjnego.

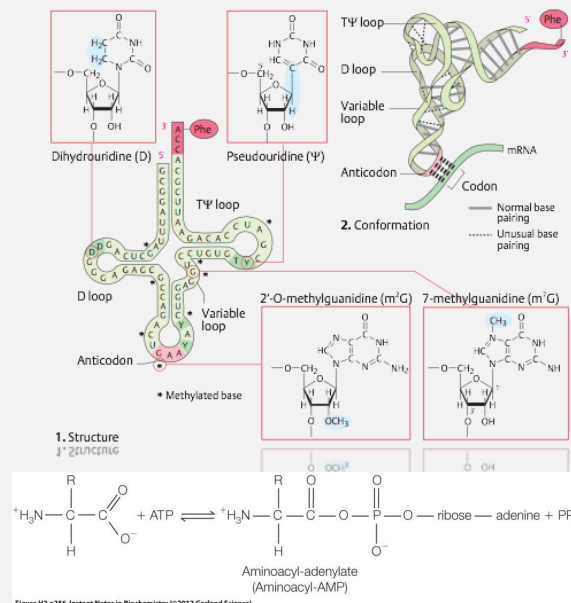
tRNA to swoista cząsteczka RNA rozpoznająca odpowiedni kodon poprzez parowanie zasad typu Watson-Crick.

tRNA transferowe RNA - to cząsteczki adapterowe, oddziałujące ze swoistymi kodonami i dostarczające aminokwasy w celu ich włączenia do łańcucha



Struktura tRNA

Niesparowane nukleotydy tworzą 5 grup:
 ramię antykodonowe;
 ramię D lub DHU zawierające *dihydrouracyl*;
 ramię T lub TΨC zawierające *pseudourydynę*;
 ramię zmienne;
 ramię aminokwasowe.

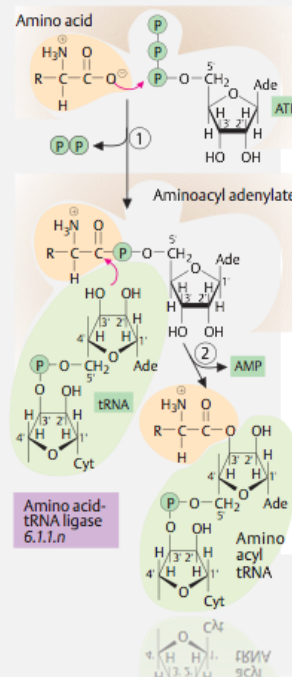


Aminoacylo-tRNA

Poprawne sparowanie tRNA z aminokwasem jest procesem kluczowym:

decyduje o poprawnym odczytaniu kodu genetycznego; przyłączenie aminokwasu powoduje jego aktywację.

Syntetaza aminoacylo-tRNA jest enzymem aktywującym



Syntetaza aminoacylo-tRNA

Każdy aminokwas posiada własną syntetazę.

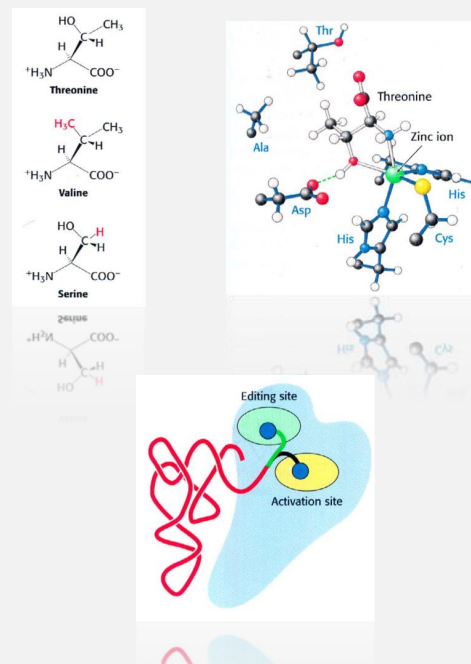
Każda syntetaza specyficznie rozpoznaje aminokwas, który aktywuje.

Syntetazy posiadają aktywność korekcyjną.

W procesie korekcji wykorzystywane są centra acylujące i hydrolityczne.

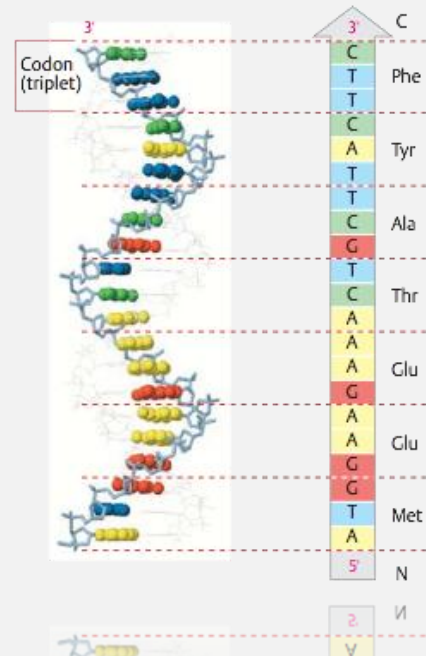
Podwójne sito pozwala na odsianie aminokwasów większych (centrum acylujące) i mniejszych (centrum hydrolityczne).

Syntetazy rozpoznają tRNA na podstawie różnych cech np. sekwencji antykodonu.



Ramki odczytu

mRNA odczytywane jest tripletach od końca 5'.
Triplet AUG jest identyfikowany jak początek sekwencji.
ORF (*ang. Open Reading Frame*) to otwarte ramki odczytu czyli wszystkie możliwe kombinacje w jakie można odczytać mRNA.



Rybosom

To molekularna maszyna koordynująca pracę trzech elementów:

mRNA;

tRNA;

enzymów.

Celem jest produkcja polipeptydów.

Rybosom *E. coli* składa się z:

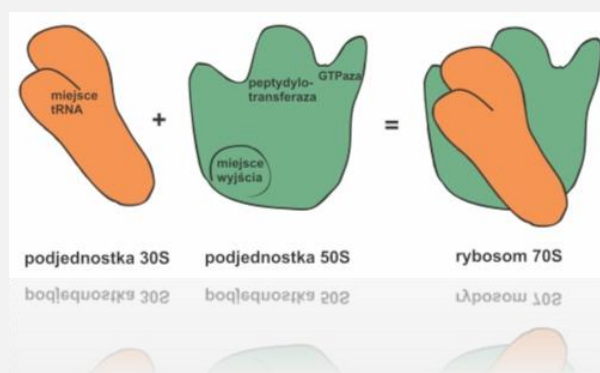
kwasów rybonukleinowych;

białek;

ma masę około 2600 kDa;

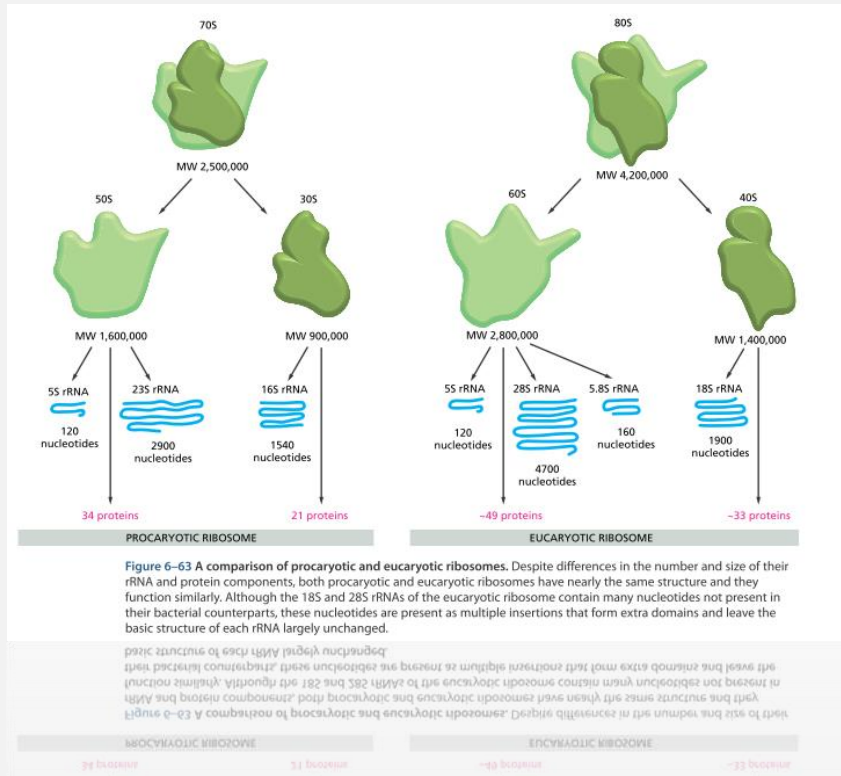
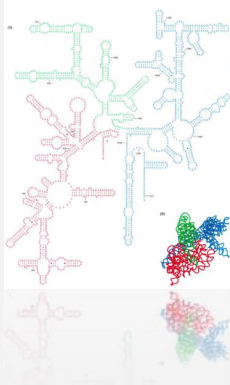
średnicę 25,0 nm;

współczynnik sedymentacji 70S.



Stała sedymentacji Svedberga jest to współczynnik określający szybkość poruszania się cząstek koloidalnych pod wpływem sił

Rybosom



Elementy funkcjonalne

A - miejsce wiązania aminoacylo-tRNA.

Miejsce, gdzie w czasie elongacji zostaje związany wprowadzony aminoacylo-tRNA.

P - miejsce wiązania peptydylo-tRNA.

rejon, gdzie zostaje związany tRNA wraz z rosnącym łańcuchem polipeptydowym.

E - miejsce wyjścia.

rejon, gdzie tRNA, który odegrał już swoją rolę w translacji jest uwalniany z rybosomu.

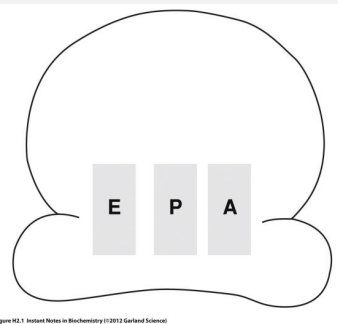
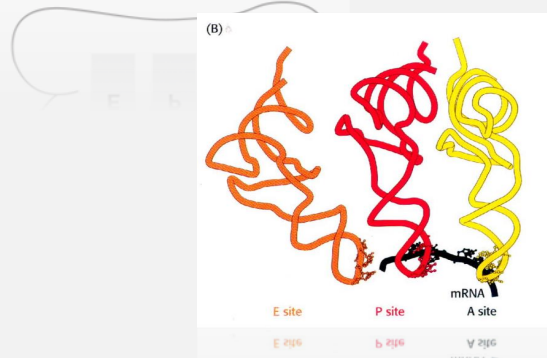
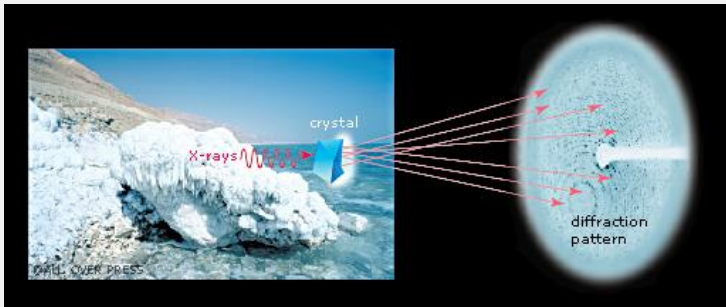


Figure 16.1 Instant Notes in Biochemistry (© 2012 Garland Science)



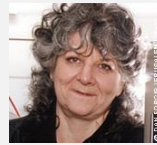
The Nobel Prize in Chemistry 2009



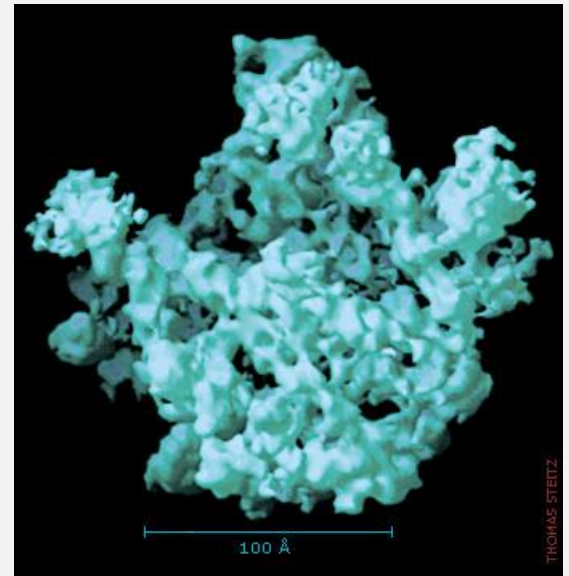
Venkatraman Ramakrishnan



Thomas A. Steitz



Ada E. Yonath



Inicjacja translacji

Etap 1

wiązanie czynników inicjujących (IF1, IF3) do mniejszej podjednostki (30S) rybosomowej, mRNA wiąże się z rybosomem poprzez sekwencję Shine-Dalgarno,

Etap 2

inicjatorowy tRNA, *N-formylometionina*, wiąże się z IF2 i GTP (fMet tRNA^{fMet}/IF2/GTP), kompleks mRNA z podjednostką 30S łączy się z wcześniej utworzonymi kompleksami, czynnik IF3 zostaje uwolniony tworząc *kompleks inicjujący 30S*,

Etap 3

jednostka 50S łączy się z kompleksem inicjującym 30S, uwolnione zostają czynniki IF1 oraz IF2 i zachodzi hydroliza

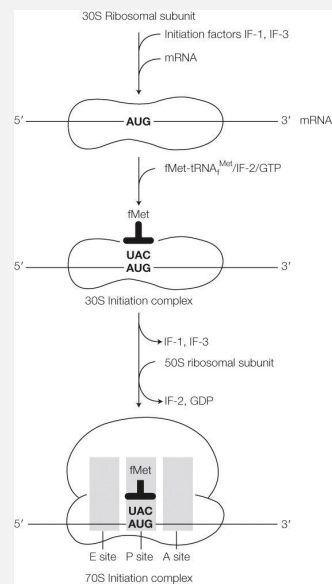


Figure H2.3 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Elongacja

Wiązanie aminoacylo-tRNA

przy udziale *czynnika elongacyjnego EF-Tu* oraz GTP odpowiednie aminoacylo-tRNA wiązane jest w miejscu A rybosomu,

Utworzenie wiązania peptydowego

w wyniku działania *peptydylotransferazy* powstaje wiązanie peptydowe.

Translokacja

czynnik elongacyjny EF-G (translokaza)

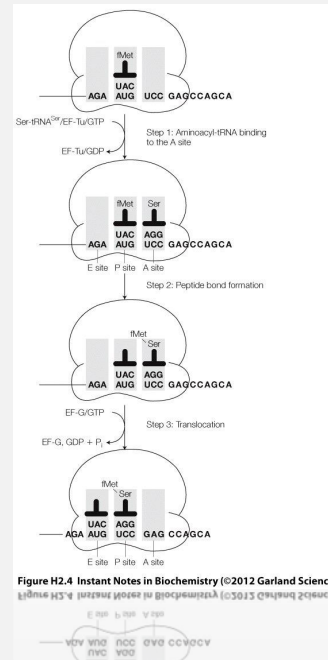


Figure H2.4 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Terminacja

W momencie napotkania kodony 'Stop' w miejscu A do miejsca aktywnego A wiąże się jeden z dwóch *czynnika uwalniających (RF1 lub RF2)*.

Po utworzeniu kompleksu z *RF3* i GTP z rybosomem peptydylotransferaza przyłącza cząsteczkę wody do terminalnego aminokwasu.

RF1 rozpoznaje UAA i UAG.

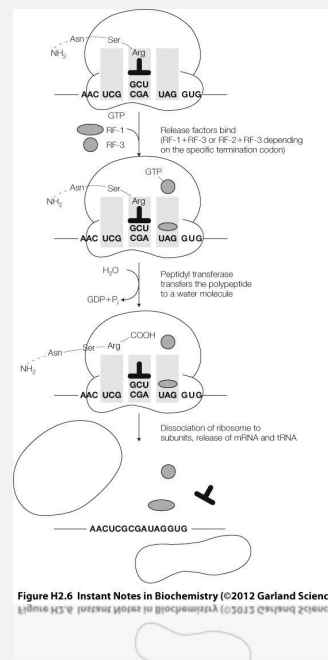


Figure H2.6 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Rybosom eukariotyczny 80S vs. rybosom prokariotyczny 70S
 mRNA monocistronowy vs. policistronowy
 czynniki inicjacji eIF vs. IF
 metionina (Met-tRNA^{iMet}) vs. N-fomylometionina
 skanowanie mRNA vs. Shine-Dalgarno

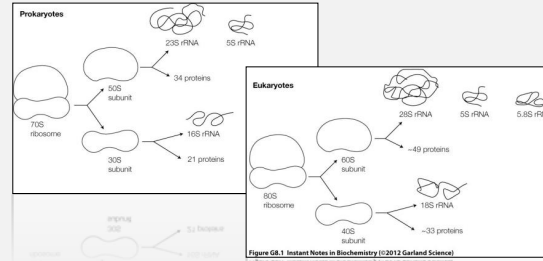


Table 1. Comparison of protein synthesis factors in prokaryotes and eukaryotes

Prokaryotic	Eukaryotic	Function
Initiation factors		
IF-1, IF-2, IF-3	At least 13 initiation factors; so far identified: eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4F, eIF-4G, eIF-4H, eIF-5, eIF-6	Individual factors have functions that differ between prokaryotes and eukaryotes (see the text)
Elongation factors		
EF-Tu	eEF-1 α	Aminoacyl-tRNA delivery to ribosome
EF-Ts	eEF-1 β	Recycling of EF-Tu or eEF-1 α
EF-G	eEF-2	Translocation
Termination factors		
RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3	Polypeptide chain release

Table M3.1 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Kierowanie białek

Kierowanie białek to proces w wyniku którego nowo zsyntetyzowane białka kierowane są do odpowiednich miejsc w komórce bądź poza nią.

Białka mogą być kierowane:

- cytozolu,
- mitochondrium,
- lizosomu,
- peroksyzomu,
- chloroplastu,
- jądra,

wbudowywane w błonę komórkową zewnętrzną
 lub wewnętrzną,

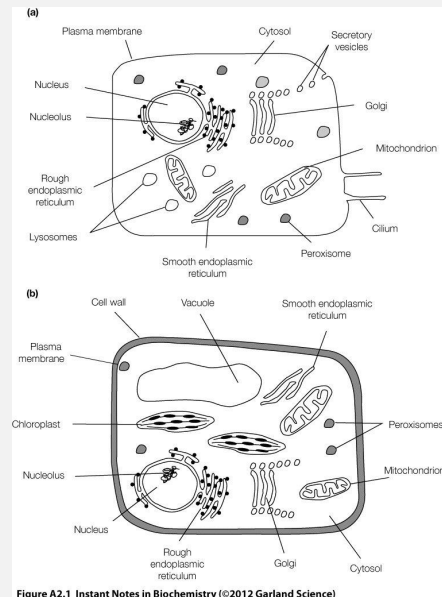


Figure A2.1 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

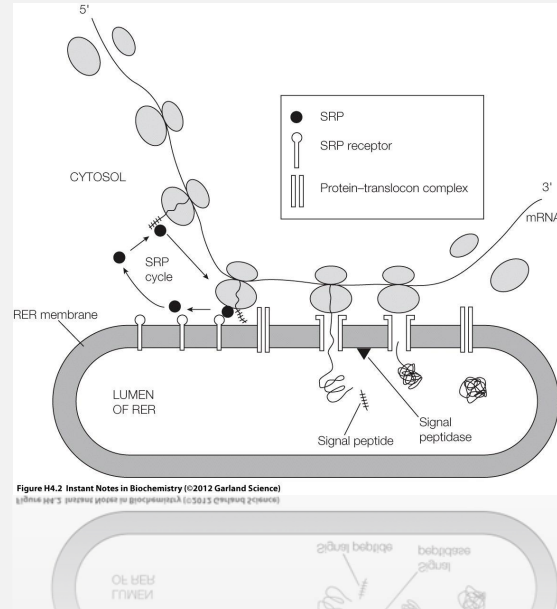
Hipoteza sygnałowa

Sekwencja sygnałowa lub peptyd sygnałowy to sekwencja aminokwasów o długości 13-35 reszt o charakterze hydrofobowym.

Peptyd sygnałowy powstaje na końcu N-białka

Do peptydu wiąże się *cząsteczka rozpoznająca sygnał (SRP, kompleks 7S RNA i 6 białek)*

Receptor SRP związany z *translokonem* kieruje białko do wnętrza ER.



Mechanizm transportu u eukariotów

Sygnał transportu do ER zawsze składa się z hydrofobowego rdzenia poprzedzanego przez jedną lub więcej reszt zasadowych.

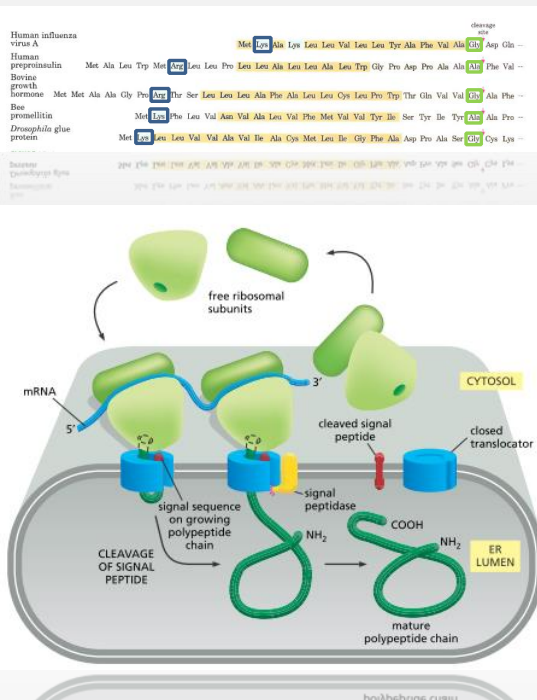
Miejsce cięcia bezpośrednio poprzedza aminokwas polarny, albo taki z bardzo małym łańcuchem bocznym.

Do rozpoznania sekwencji sygnałowej potrzebne są dwa składniki:

SRP (cząsteczka rozpoznająca sygnał)

receptor SRP (system ten jest obecny we wszystkich komórkach eukariotycznych więc jest bardzo stary ewolucyjnie)

Cząsteczka *SRP* ma dużą hydrofobową kieszeń, która wiąże peptyd sygnałowy. W kieszeni znajdują się metioniny, które mają nierozgałęziony, elastyczny boczny łańcuch – dzięki temu kieszeń



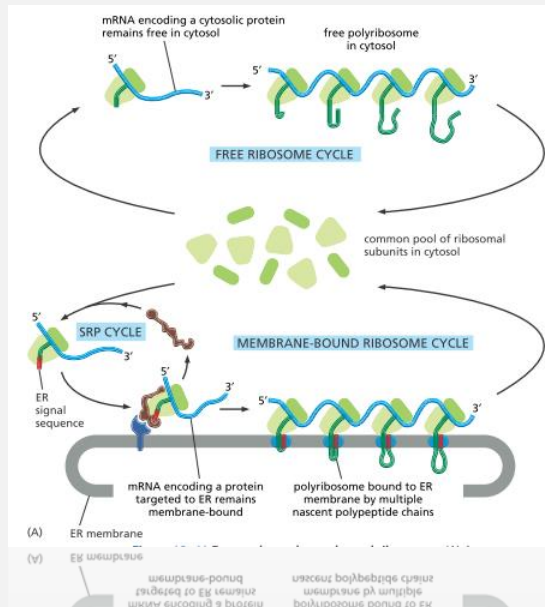
Transport ko- vs. po-translacyjny

Wszystkie białka są syntetyzowane na tej samej puli rybosomów – niektóre po prostu zostają w cytoplazmie a niektóre są wiązane z ER.

Jeżeli z sekwencją sygnałową zwiąże się SRP (*ang. Signal Recognition Peptide*) – rybosom wędruje do błony ER.

Cząsteczka mRNA jest trwale związana z ER jako, że jest integralną częścią rybosomu (lub polisomu).

Rybosomy, które kończą syntezę rozdysocjują na podjednostki i



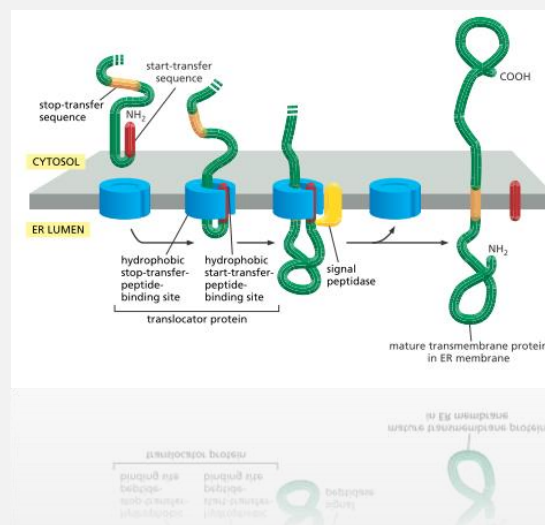
Transport ko- vs. po-translacyjny

Model wyjaśniający transport białka z jedną helisą transbłonową.

białko takie zostaje wbudowane w błonę ER (np. białka integralne błony);

sekwencja sygnałowa -*początek translacji*, na N końcu funkcjonuje jako sygnał startu translacji, białko posiada drugi sygnał wewnątrz sekwencji – *koniec translacji*.

wszystko przebiega tak jak poprzednio, ale kiedy sekwencja stop wejdzie do *translokazy*, peptydaza sygnałowa odcina sekwencje startu. translokaza zmienia



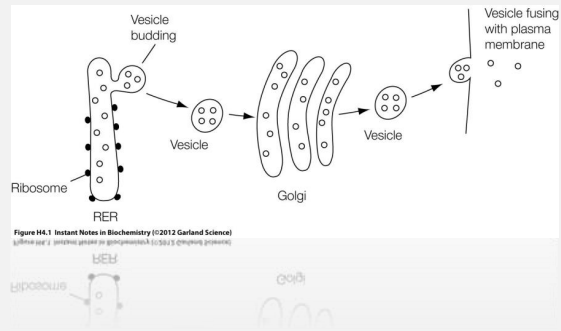
Białka sekrecyjne

U eukariotów

synteza zachodzi w szorstkim retykulum endoplazmatycznym (RER)

fałdowanie zachodzi w świetle RER

w aparacie Golgiego (kompleksie Golgiego) białka ulegają dalszej modyfikacji (np. glikozylacja)

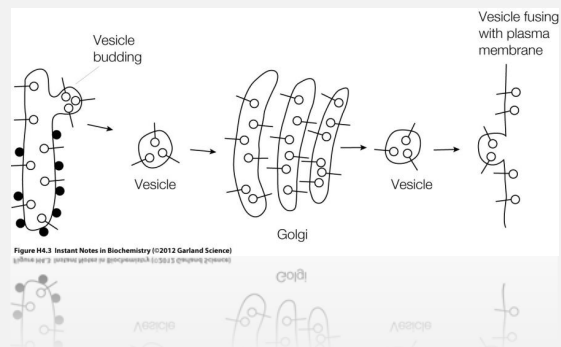


Białka błony komórkowej

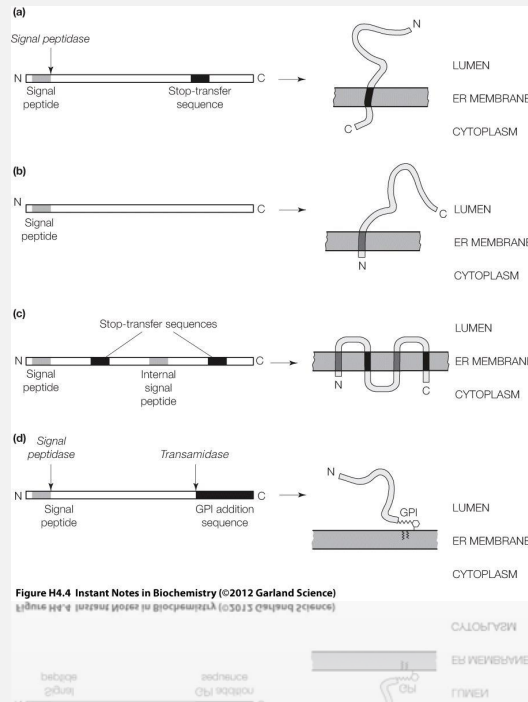
Podobnie jak białka sekrecyjne po translacji białka błonowe trafiają do aparatu Golgiego ale w związku ze swoim przeznaczeniem nie opuszczają one błony od momentu syntezy do momentu wbudowania.

Orientacja białka w błonie jest zdeterminowana już w momencie syntezy.

Sekwencje topogenne (sekwencje sygnałowe przy końcu N, wewnętrzne



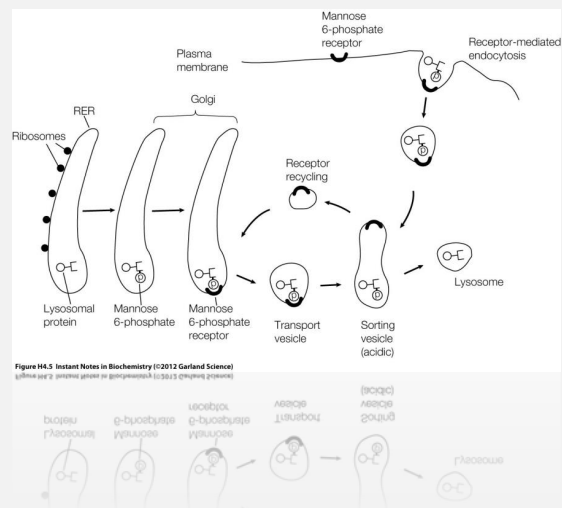
Białka błonowe



Białka lizosomowe

Mannozo-6-fosforan przyłączany do białek lizosomowych jest odpowiedzialny wraz z błonowym receptorem mannozo-6-fosforanowym za kierowanie białek do lizosomów.

Inną drogą kierowania białek do lizosomu jest *droga zbierania* (ang. *scavenger pathway*) i proces *endocytozy kierowanej receptorami*.



Mechanizm transportu u prokariota

| Sec

Istnieje możliwość transportu w trakcie translacji (kotrancylnie).

N koniec białka jest rozpoznawany przez maszynę transportującą w poprzek błony.

Białka eksportowe mają na końcu N sekwencję liderową (składającą się z części hydrofilowej na końcu N i przylegającej do niej części hydrofobowej)

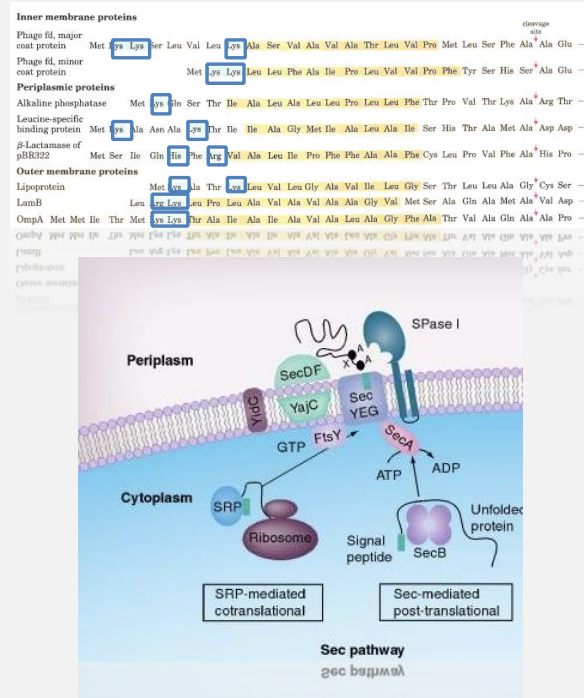
Białko podlega zmianom konformacyjnym w czasie transportu np. β -laktamaza (enzym rozkładający ampicylinę) w cytoplazmie i w trakcie przechodzenia przez błonę jest wrażliwa na trawienie trypsyną, natomiast w przestrzeni perioplazmatycznej już nie (ma schowane miejsce rozpoznawalne przez tę proteazę).

Białka, które mają być przetransportowane przez błonę są opłaszczane czaperonem (białkiem opiekuńczym) SecA.

SecA rozpoznaje białko SecB (peryferyjne białko błony o charakterze ATPazy).

Następuje hydroliza ATP i transportowane białko jest przekazywane SecE i SecY

Pierwsze 20 aminokwasów transportowanego białka zostaje

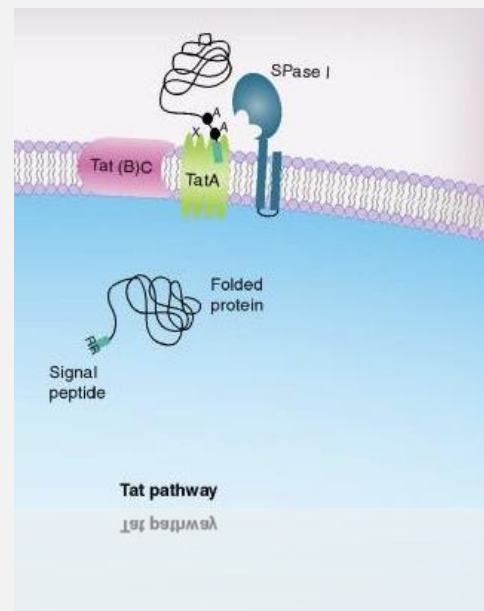


Mechanizm transportu u prokariota

| Tat

Tat (ang. *twin-arginine translocation pathway*, *Tat pathway*) jest, podobnie jak ścieżka Sec, metodą transportu i wydzielania białek. Występuje one u roślin, bakterii i archei.

W przeciwieństwie do ścieżki Sec białka transportowane w formie sfalowanej.



Modyfikacje potranslacyjne

Pierwsza modyfikacja – odcięcie *N-formylometioniny* z N-końca przez specyficzną peptydazę.

50% białek eukariotycznych ma grupę aminową z końca N acetylowaną.

Usuwanie sekwencji liderowej, sygnałowej.

Modyfikacje indywidualnych aminokwasów:

grupy hydroksylowe (Ser, Thr, Tyr) – fosforylacja;

Glu, Asp – dodatkowe grupy karboksylowe;

Lys – metylacja;

fosforylacja;

glikozylacja;

metylacja;

N-acetylowanie;

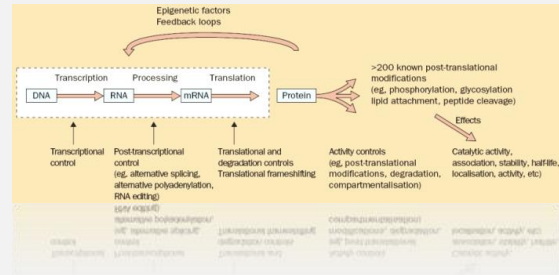
nitrylowanie;

lipidylacja;

SUMOylacja;

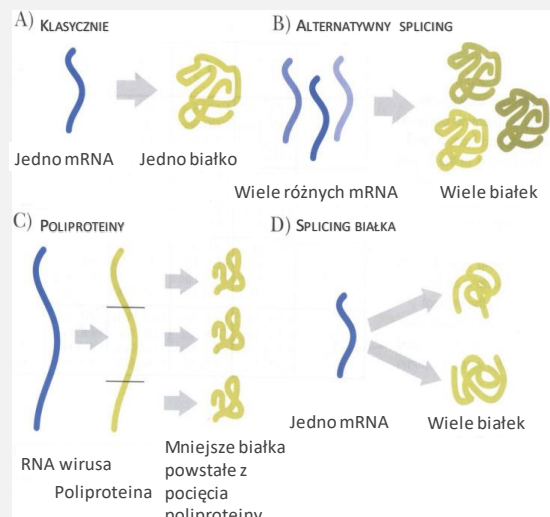
Podział w zależności od mechanizmu:

kwantylacja, podział, grup funkcyjnych



Jak wiele białek?

Składanie białek zwane inaczej *splicingiem białek* to modyfikacja potranslacyjna, w której przepływ informacji z genu do jego produktu białkowego jest modulowany w sposób pozwalający na powstanie dwóch funkcjonalnie nie związanych białek.



Składanie białek

Z łańcucha polipeptydowego zostaje wycięty wewnętrzny segment (zwykle 40-60kDa) – inteina.

Dwa segmenty zewnętrzne (eksteiny) zostają połączone za pomocą wiązaniem peptydowym.

Pierwotny produkt translacji to *białko prekursorowe*.

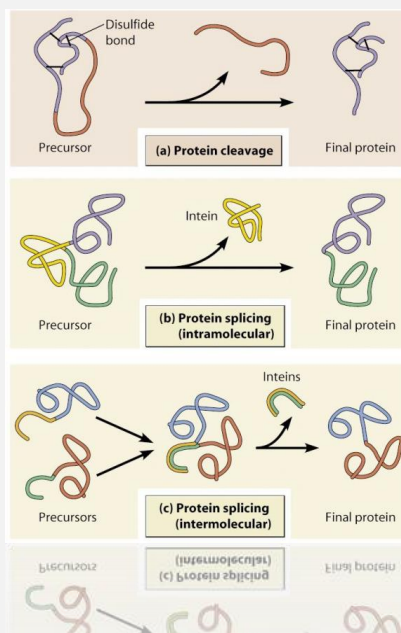
Produkt składania to białko dojrzałe lub złożone.

Reakcja przebiega *autokatalitycznie*, bez udziału innych enzymów.

Stwarza dodatkowe możliwości powstawania białek o nowej funkcji.

Znanych jest ponad 350 białek zawierających inteiny (150 u eubakterii, 110 u archebakterii, 70 u eukariontów, a także u wirusów i fagów).

Znaidowane w enzymach metabolicznych.



Modyfikacja kowalencyjne - zestawienie

Nazwa modyfikacji	Modyfikowany aminokwas	Opis modyfikacji	Enzym katalizujący reakcję
Fosforylacja /defosforylacja	tyrozyna, treonina, seryna, (histydyna, lizyna, arginina, cysteina)	Przenoszenie grupy P^- -fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową łańcucha bocznego aminokwasu	Kinazy/fosfatazy
Acetylacja	Lizyna	Przenoszenie grupy acetylowej z acetyloCoA na grupę Σ -aminową lizyny	Acetylotransferazy
Acyłacja: - mirystylacja - palmitylacja	- glicyna na N- końcu polipeptydu - cysteina	- przeniesienie reszty kwasu mirystynowego (C14) na glicynę - przeniesienie reszty kwasu palmitynowego z palmitoilo-CoA na grupę hydrosulfidową reszt cysteiny	NMT (N-mirystyltransferaza)
Formylacja	metionina	tworzenie N-formylometioniny przez przeniesienie grupy formylowej na N-końcową metioninę	transformylaza
Metylacja	aminokwasy zasadowe, glutamina, asparagina	przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny lub betainy na atom N (lub O dla Asn) łańcucha bocznego aminokwasu	metylotransferazy
Prenylacja: farnezyłacja geranylogeranyłacja	cysteina	przyłączanie do białek pochodnych izoprenowych: grupy farnezyłowa (C15) lub geranylogeranyłowa (C20)	

Modyfikacja kowalencyjne - zestawienie

Nazwa modyfikacji	Modyfikowany aminokwas	Opis modyfikacji	Enzym katalizujący reakcję
Glikozylacja	asparagina, seryna, treonina	przyłączanie cukrowców do atomów N lub O reszt aminokwasowych	glikozylotransferazy
Sulfonowanie	tyrozyna	przeniesienie grupy sulfonowej z PAPS na resztę tyrozynową	sulfotransferaza
Ubikwitynizacja	Lizyna	połączenie C-końcowej glicyny ubikwityny z grupą Σ -aminową lizyny	ligazy E1, E2, E3
Mono-ADP-rybozylacja	arginina	przeniesienie pojedynczej reszty ADP-rybozy z NAD na białko	mono-ADP-rybozylotransferaza
Poli-ADP-rybozylacja	kwas glutaminowy, fosfoseryna	tworzenie łańcucha poli-ADP-rybozy następujące po mono-ADP-rybozylacji	syntaza poli(ADPR)
Adenylacja	tyrozyna, seryna, treonina	przyłączenie AMP do grupy hydroksylowej łańcucha bocznego aminokwasu	transferaza adenylilowa
Sumoilacja	Lizyna	przyłączenie małej cząsteczki białka SUMO-1 przez wiązanie grupy karboksylowej glicyny z grupą Σ -aminową białka	enzym sprzęgający
Powstawanie kotwic GPI	C-końiec białka	przyłączenie jednostki glikozylofosfatydyloinozytolowej do C-końca polipeptydu	

Fosforylacja

Najbardziej powszechna kowalencyjna, *odwracalna* modyfikacja, szacuje się że ok. 1/3 białek może być fosforylowana.

U eukariontów Ser, Thr, Tyr, u prokariotów His i Asp.

Grupy fosforanowe dodawane są przez enzymy – *kinazy*, usuwane przez *fosfatazy*.

Fosforylacja powoduje przyłączenie naładowanej nowej grupy, która może tworzyć nowe wiązania wodorowe z amidami łańcucha głównego albo mostki solne z arginina.

Powoduje to bardzo istotne zmiany konformacyjne białek, ich aktywację lub deaktywację:

np. fosforylaza glikogenu: ufosforylowanie seryny¹⁴ powoduje całkowitą zmianę konformacji końca N, łańcuch boczny seryny przesuwając o 50 Å i zmienia powierzchnię kontaktu podjednostek



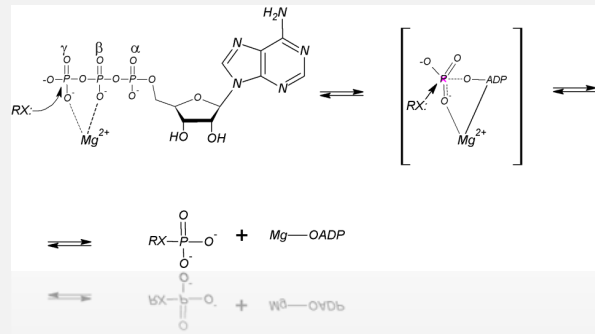
Fosforylacja

Reakcja katalizowana przez kinazy białkowe.

Jako kosubstrat występuje ATP dostarczający grupy γ -fosforanowej (γ -PO₄). Kation Mg²⁺ chelatowany przez dwa aniony tlenowe grup fosforanowych cząsteczki ATP ułatwia przeniesienie grupy γ -PO₄ na grupę hydroksylową reszty aminokwasowej

Reakcję rozpoczyna regioselektywny atak grupy hydroksylowej łańcucha bocznego aminokwasu na elektrofilową grupę γ -fosforanową kompleksu Mg-ATP, zachodzi to przy specyficznym położeniu substratów w centrum aktywnym kinazy. Powstaje stan przejściowy, w którym rozrywane jest wiązanie γ P-O

W centrum aktywnym kinaz znajduje się miejsce wiążące ATP, które jest konserwatywne i różni się tylko nieznacznie budową łańcuchów bocznych kinazy co wpływa na powinowactwo wiązania. Natomiast miejsca wiążące fosforylowany substrat mają różną budowę zarówno w zależności od aminokwasu podlegającego reakcji (miejsca wiążące tworzone tworzą głębsza kieszeń niż miejsca wiążące



Glikozylacja

Polega na przyłączeniu reszt cukrowych do aminokwasów, szacuje się, że połowa białek w komórkach jest glikozylowana

Mechanizmy glikozylacji stwierdzono u wszystkich organizmów: eu-, prokariotycznych i Archea

Glikozylowane są zarówno białka sekrecyjne, jak i ligandy na powierzchni komórek i białka cytoplazmatyczne

Powoduje ochronę przed proteolizą, wpływa na aktywność enzymatyczną, ułatwia zwijanie białek, zwiększa rozpuszczalność, zapobiega agregacji, wpływa na immunogenność, blokuje fosforylację, wpływa na oddziaływania białko-białko

W ER jest wykorzystywana do sprawdzania poprawności fałdowania białka

Powoduje bardzo duże zmiany składu białkowego komórek – proteomu, zmieniając drastycznie masę białka i punkt izoelektryczny

Mogą powstać tysiące wariantów glikozylowanego białka ze względu na różnice w

• sposobie przyłączenia reszt cukrowych

• składzie – typie cukrów dołączonych do białka

• strukturze – łańcuchy rozgałęzione/nierozgałęzione

• długości i ilości łańcuchów cukrowych

wyróżnia się dwa podstawowe typy glikozylacji: O- i N-glikozylację

O-glikozylacja

poddawane są tej modyfikacji głównie białka matrix międzykomórkowej, ale także np. przeciwciała

O-glikozylacja zachodzi potranslacyjnie poprzez przyłączenie cukrowców do grupy hydroksylowej seryny, treoniny lub hydroksyproliny i hydroksylizyny jak ma to miejsce w przypadku kolagenu

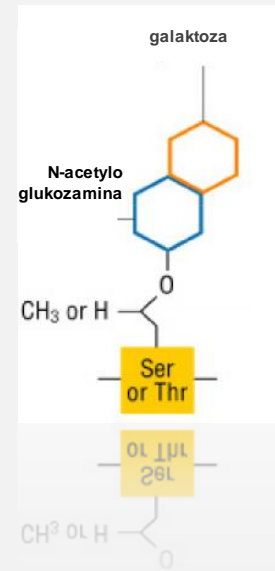
zachodzi w aparacie Golgiego i powstająca struktura cukrowcowa jest znacznie prostsza niż przy N-glikozylacji

zachodzi przy pomocy glikozylotransferaz – N-acetyloglukozaminowej lub N-acetylogalaktozaminowej, które dołączają pierwszy segment do aminokwasu - N-acetyloglukozaminę lub N-acetylogalaktozaminę

następnie może dojść do przyłączania kolejno następnych reszt monocukrowych

następuje drogą glikozylacji sekwencyjnej, tj. kolejno następującego po sobie przyłączania reszt monocukrowych do białka

produkt działania jednej glikozylotransferazy staje się



N-glikozylacja

jest modyfikacją kotranslacyjną – powstaje w trakcie syntezy białka w ER około 90% białek glikozylowanych jest modyfikowanych w ten sposób

polega na przyłączaniu reszt cukrowcowych do azotu grupy aminowej bocznych łańcuchów asparagin w sekwencji AsnXSer lub AsnXThr

część cukrowcowa N-glikoprotein jest większa i bardziej skomplikowana niż O-glikoprotein

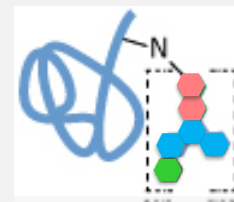
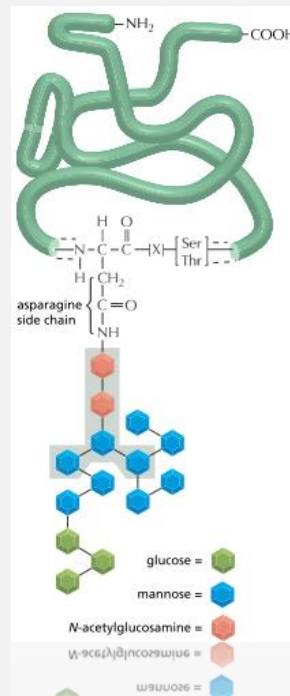
przebiega w kilku etapach:

składanie prekursora – pierwszy dołączony jest 14 członowy prekursor zbudowany z N-acetyloglukozaminy, mannozy i glukozy. 7 pierwszych cząsteczek przyłącza się do dolicholu (lipid błony ER) w cytoplazmie poprzez wiązanie pirofosforanowe. Po stworzeniu pierwotnego rdzenia Man5GlcNAc2-PP-dolichol przechodzi do światła ER, tam dodawane jest pozostałe 7 reszt i powstaje kompletny prekursor: Gc13Man9GlcNAc2-PP-dolichol

przyłączenie prekursora – czeka na białko przyłączony do dolicholu

przycinanie – glikozydazy i glikozylotransferazy odcinają i dokładają glukozy od końca rdzenia aż do momentu kiedy białko jest prawidłowo sfałdowane. Wszystkie prawidłowo sfałdowane glikoproteiny przechodzące do aparatu Golgiego mają sekwencję Man9GlcNAc2

dojrzwianie w AG – do tego momentu wszystkie N-glikoproteiny wyglądają tak samo, dopiero teraz dodawany jest charakterystyczny, indywidualny wzór glikozylacji. Mannozydazy I i II oraz transferaza N-acetyloglukozaminy doprowadzają do powstania wspólnego rdzenia a następnie dołączane są reszty glikozylowe pochodzące z UDP-cukrów



N-glikozylacja

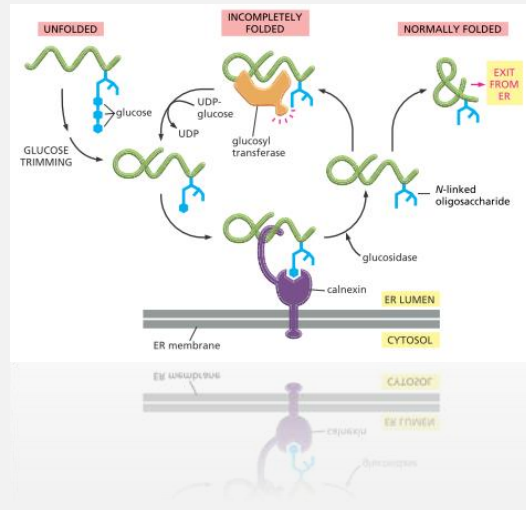
przyłączanie i odłączanie reszt cukrowcowych jest sposobem na sprawdzenie czy białko prawidłowo się sfałdowało – kluczową rolę odgrywają dwa czaperony – kalneksyna i kalretikulina, oba wymagające jonów wapnia do prawidłowego działania

glikozydaza odcina dwie końcowe reszty glukozy a do jednej pozostałej przyłączają się te 2 czaperony, pomagając się białku fałdować

następnie glikozylaza przecina wiązanie łączące mannozę z glukozą odłączając tym samym czaperony od białka

jeżeli białko nie jest prawidłowo sfałdowane to zostaje rozpoznane przez glikozylotransferazę UDP-glukozy-glikoproteinową, która dołącza resztę glukozy, dzięki czemu białko ponownie jest rozpoznawane przez czaperony i cykl fałdowania się powtarza. Cykl może być powtarzany wielokrotnie, w momencie kiedy białko jest prawidłowo sfałdowane, nie ulega już glikozylacji

białko zakotwiczone w błonie ER i będące w jego świetle za pośrednictwem pęcherzyków transportujących przechodzą do AG gdzie reszty cukrowcowe podlegają dalszym modyfikacjom



Kotwiczenie glikozylfosfatydyloinozytolem

czasami zaliczana do glikozylacji;

odwracalna modyfikacja polegająca na dołączeniu poprzez łącznik węglowodanowy kotwicy glikozylfosfatydyloinozytulu (GPI) lokuje ona białko po zewnętrznej stronie błony komórkowej na elastycznym łączniku;

kotwica zbudowana jest z fosfoetanolaminowego linkera, który wiąże się z C-końcem białka, cukrowcowego rdzenia oraz fosfolipidowego ogona, który zakotwicza strukturę w błonie;

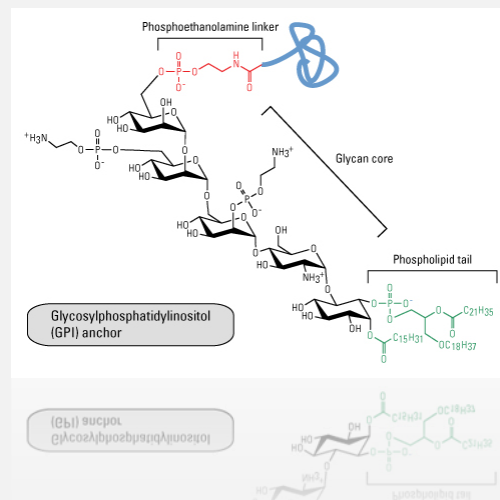
służy do regulacji funkcji białka – enzym związany z GPI jest nieaktywny uaktywnienie następuje poprzez działanie fosfolipazy;

ale wiele enzymów jest w ten sposób przytwierdzonych w aktywnej formie np. fosfataza alkaliczna;

białka, które mają ulec tej modyfikacji muszą posiadać 2 sekwencje sygnałowe:

na N-końcu sekwencję sugerującą transport kotranslacyjny do ER

na C-końcu sekwencję rozpoznawaną przez transaminazę GPI



Synteza chemiczna

w chemii organicznej *synteza peptydu*

to produkcja peptydów, które są zbudowane z liniowo połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym aminokwasów;

proces biologiczny w którym zachodzi ta reakcja nazywa się biosyntezą peptydu;

synteza większych cząsteczek nazywa się syntezą/biosyntezą białek;

peptyd czy białko?

do 10 AA - oligopeptyd,

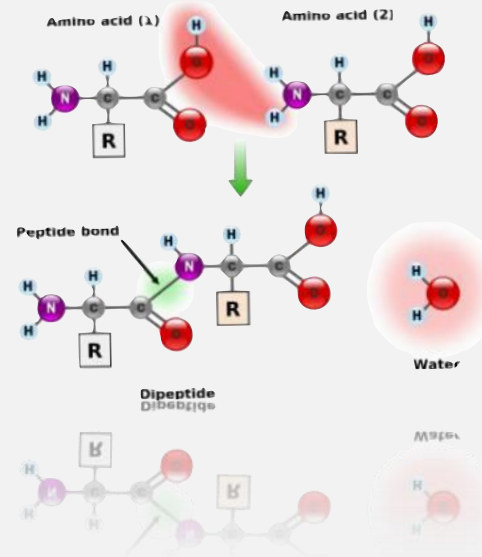
do 100 AA - polipeptyd,

powyżej 100 AA - białko;

przez możliwość niechcianych reakcji zazwyczaj stosuje się blokowanie grup funkcyjnych odpowiednimi osłonami

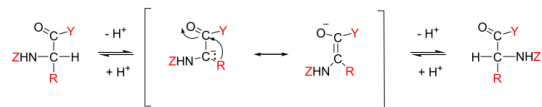
chemiczna synteza peptydu rozpoczyna się na końcu C a kończy na N, czyli odwrotnie niż w biosyntezie;

reakcję przeprowadza się albo w roztworze (*liquid-phase peptide synthesis*) lub w fazie stałej (*solid-phase peptide synthesis*)

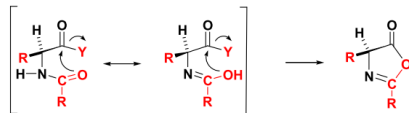


Racemizacja

1 Bezpośrednia

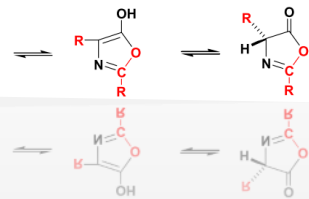


2 Pośrednia przez azolakton



Z – osłona grupy amionowej
Y – osłona grupy karboksylowej
R – reszta aminokwasowa

Racemizacja to proces powstania enancjomerami.



czystymi

Ochrona grup funkcyjnych

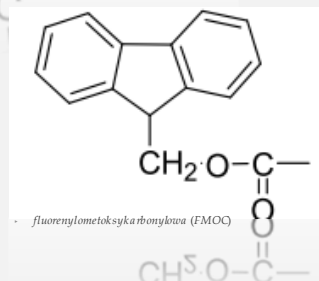
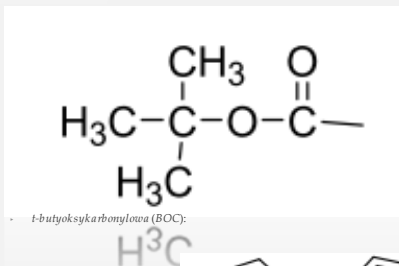
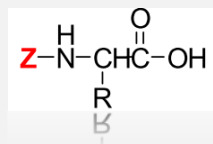
Grupa aminowa

t-butyloksykarbonylowa (BOC):

- trwała w środowisku zasadowym;
- kwasolabilna;
- selektywne warunki usuwania;
- niski koszt odczynnika;
- wysoka rozpuszczalność peptydu;
- wysoka czystość peptydów hydrofobowych;
- rzadko problemy z agregacją;
- stosunkowo krótki czas syntezy;
- potencjalnie niebezpieczny dla zdrowia;

fluorenylometoksykarbonylowa (Fmoc):

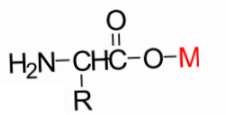
- odporna w środowisku kwaśnym;
- zasadolabilna;
- wrażliwa na katalityczną redukcję;
- odczynnik drogi;
- niska rozpuszczalność peptydów;
- niska czystość peptydów hydrofobowych;
- czasami problemy z agregacją;



Ochrona grup funkcyjnych

Grupa karboksylowa

do ochrony grupy karboksylowej stosuje się reakcję estryfikacji;



Metanol	—CH ₃	Me
Etanol	—CH ₂ CH ₃	Et
<i>tert</i> -Butanol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	t-Bu
Fenol	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ -\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	BZI
<i>p</i> -Nitrofenol	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \end{array}$	NBZI

klasyczne podejście;

ma ogromne znaczenie w produkcji peptydów na skalę przemysłową;

stosuje się tu dwufazowe roztwory na bazie cykloheksanu;

w fazie homogennej zachodzi reakcja, po rozdzieleniu w jednej fazie jest produkt a w drugiej zużyty substrat;

główną wadą tej metody jest to, że po każdej pojedynczej reakcji trzeba oczyszczać produkt (a więc wcześniej go odseparować) i usuwać zużyty substrat;

stworzona przez Merrifielda (1963);

propagacja łańcucha peptydowego na nierozpuszczalnej żywicy polimerowej;

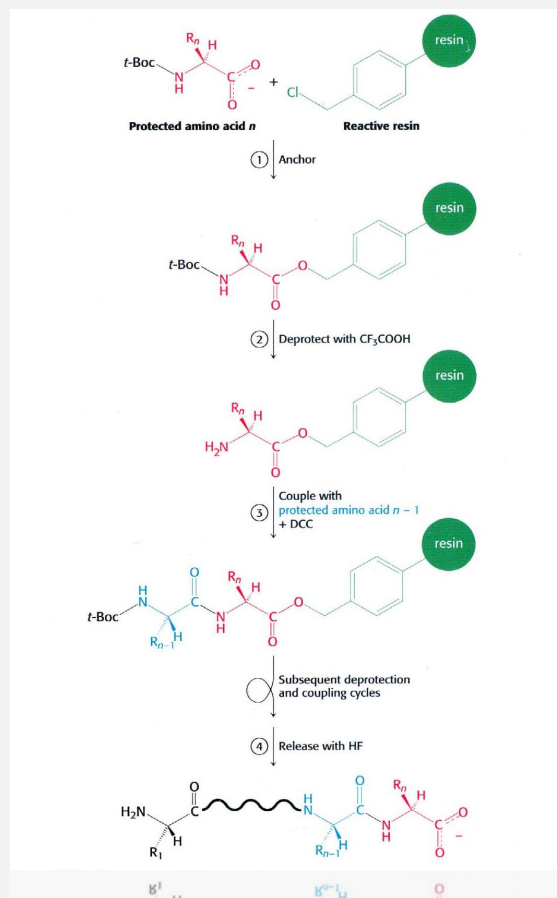
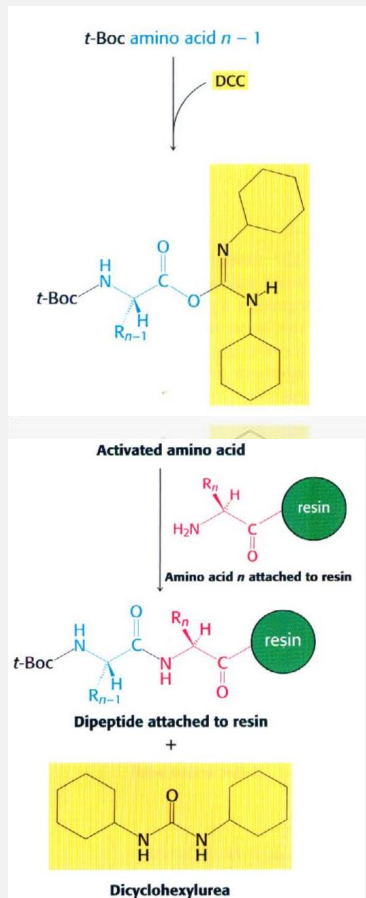
dzięki temu przyłączenie kolejnego aminokwasu poprzedzone jest tylko obmyciem z żywicy z peptydem produktów ubocznych i nieprzereagowanych substratów;

możliwe jest też stosowanie nadmiaru jednego z reagentów celem zwiększenia wydajności oraz częściowej lub nawet całkowitej automatyzacji procesu ;

wybór odpowiedniej żywicy determinuje struktura pożądanego peptydu, np. to, czy ma posiadać wolną grupę karboksylową na C-końcowym aminokwasie, czy też grupę amidową;

najczęściej stosowane są żywice polistyrenowe sieciowane diwinylobenzenem z przyłączonym labilnym w środowisku kwaśnym łącznikiem (tzw. „linkerem”);

odczepienie zsyntetyzowanego polipeptydu od nośnika następuje poprzez reakcję z kwasem tróchloroacetylowym;



Enzymatyczna synteza białek

Najczęściej do syntezy białek stosuje się nadekspresję (mała wydajność) i chemiczną syntezę (niebezpieczeństwo recemizacji).

Alternatywnie można także zaprząć do pracy enzymy proteolityczne.

W warunkach fizjologicznych enzymy proteolityczne katalizują hydrolizę wiązania peptydowego, ale zdolne są również katalizować reakcję odwrotną, to jest reakcję syntezy tego wiązania, synteza zachodzi wówczas stereoselektywnie i nie jest wymagane blokowanie funkcyjnych grup bocznych aminokwasów

Stosowane enzymy :

chymotrypsyna

papaina

alkalaza

pronaza

acylaza penicyliny

Synteza...

Synteza chemiczna na nośniku stałym

Stosunkowo stara metoda – dobrze opracowane protokoły

Droga (kosztowne substraty, z grupami osłonowymi i obniżenie wydajności jeżeli się z nich zrezygnuje)

Często bardzo wymagające warunki i szkodliwe substraty

Synteza enzymatyczna

- Metoda nowa, nie ma opracowanych protokołów
- Tanie (mniej sprzętu, odczynników, ludzi, energii)
- Nieszkodliwe warunki
- Tylko krótkie peptydy (ale głównie dlatego, że nie ma automatyzacji – słabo rozwinięta technologia)

Fałdowanie białek

Białko prawidłowo sfaldowane jest aktywne biologicznie, białko rozfałdowane/zdenaturowane jest biologicznie nieaktywne.

W po prawnym fałdowaniu pomagają:

czaperoniny;

czaperony;

ko-czaperony (białka towarzyszące czaperonom i czaperoninom w fałdowaniu białek i innych funkcjach);

Odpowiadają one także za:

oligomeryzację białek, translokację i degradowanie;

występują u wszystkich organizmów od bakterii po ludzi;

zapobiegają nieprawidłowemu łączeniu się łańcuchów białkowych w нефunkcjonalne struktury;

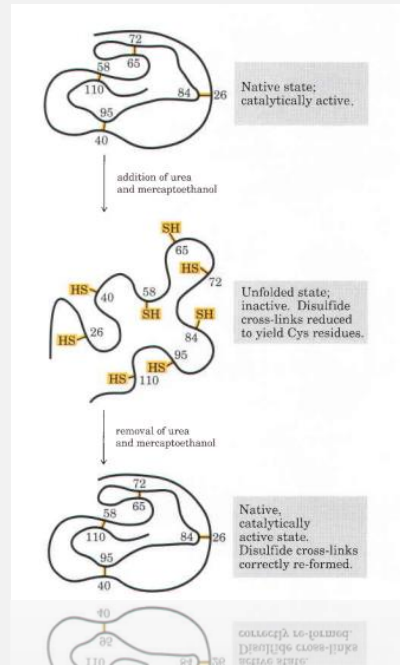
Molekularne czaperony potrzebne są zarówno w trakcie syntezy białka, ale także np. w warunkach stresowych kiedy dochodzi do uszkodzeń. Należą do białek szoku cieplnego (HSP) – odkryto je u

Łądowanie białek

Białka ładujące się bez pomocy czaperonów po denaturacji są w stanie wrócić do prawidłowej konformacji (oczywiście jeżeli denaturacja nie zniszczyła struktury).

Przykład rybonukleazy – mocznik zniszczył wiązania wodorowe, beta-merkaptoetanol mostki dwusiarczkowe.

Renaturacja spowodowała



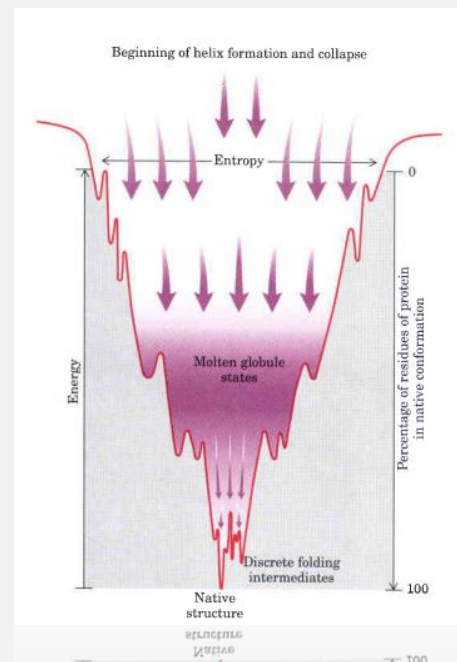
Łądowanie białek

Termodynamika ładowania białek

Na górze wiele różnych konformacji, więc entropia także jest duża;

W miarę ładowania, ścieżka termodynamiczna prowadzi w dół lejka;

Zagłębienia na dnie lejka;

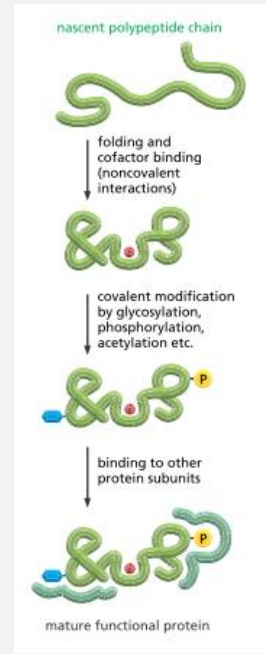


Sekwencja fałdowania

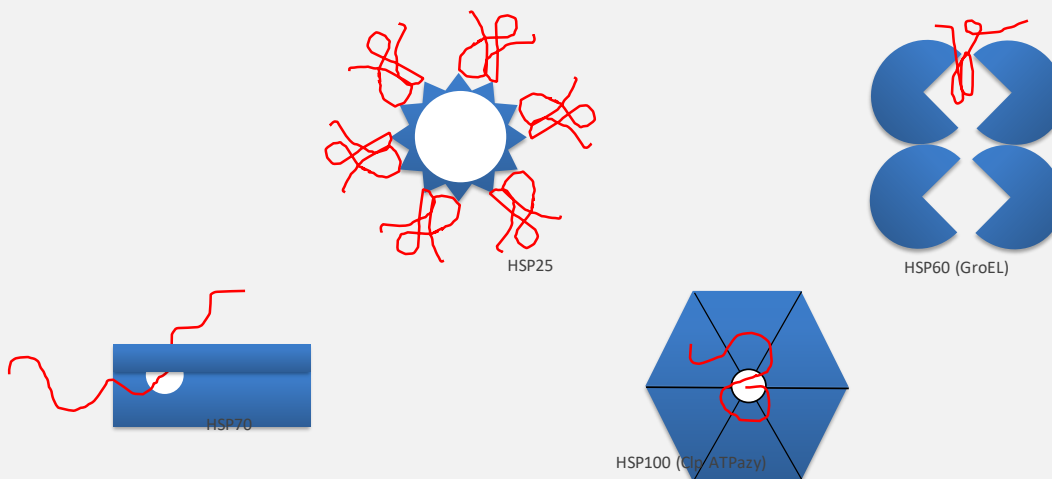
- wiązanie kofaktora (interakcja niekowalencyjna);
- modyfikacje kowalencyjne (glikozylacja, fosforylacja);
- łączenie podjednostek (jeżeli białko jest oligomerem);

Niektóre białka fałdują się kotranslacyjnie – fragment wychodzący z rybosomu od razu zaczyna przybierać konformację;

Najpierw fałduje się koniec N, na końcu C, białko nie uzyska końcowej konformacji



Odziaływanie białko - czaperon

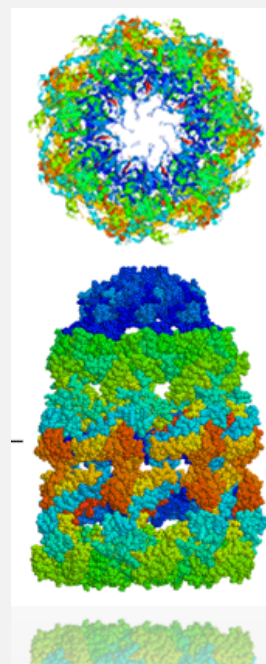


Czaperoniny

Kompleksy białkowe uczestniczące w fałdowaniu nowo powstających białek:
pracują na koszt hydrolizy ATP
dzieli się je na dwie grupy: I i II

Czaperoniny: Grupa I

występują u bakterii i w organellach (chloroplastach i mitochondriach);
najlepiej poznanym kompleksem z tej grupy jest GroEL/GroES (HSP60) z *E. coli*;
ma masę nieco poniżej 1 MDa;
GroEL (czaperonina 60) – dwa pierścienie zbudowane z 7 podjednostek każda;
część apikalna podjednostek jest hydrofobowym miejscem wiązania – co powoduje, że faworyzowane są niesfałdowane białka, część równikowa wiąże ATP ;



Działanie GroES/GroEL

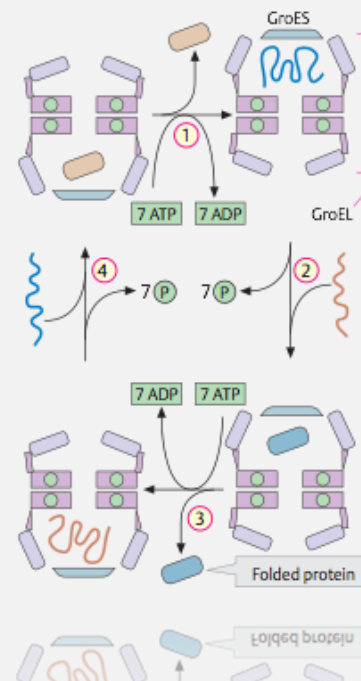
zapewniają zamkniętą przestrzeń, gdzie pojedyncza cząsteczka białka może się sfałdować;

u *E. coli* znaleziono 85 białek, które były ściśle zależne od GroEL;

związanie niesfałdowanego białka przez region cis GroEL powoduje automatyczne związanie ATP i podjednostki GroES;

substrat zostaje zamknięty w komorze gdzie może się swobodnie fałdować;

hydroliza ATP i związanie ATP z pierścieniem trans powodują odłączenie GroES i uwolnienie



Nieprawidłowo pofałdowane białka

Choroba

Choroba Alzheimerera
Plaszczyca Huntingtona
Amyloidoza lizozymowa
Choroba Parkinsona
Zakaźne encefalopatie gąbczaste
Amyloidoza nerek
Stwardnienie zanikowe boczne

Uszkodzone białko

β amyloid
Huntingtyna
Lizozym
 α synukleina
Białka prionowe
Fibrynogen
Dysmutaza ponadtenkowa

Degradacja białek

Białka degradowane są do aminokwasów.

Rozkład białek ma dwa aspekty:

przyswojenie składników pokarmowych;

recycling składników budulcowych;

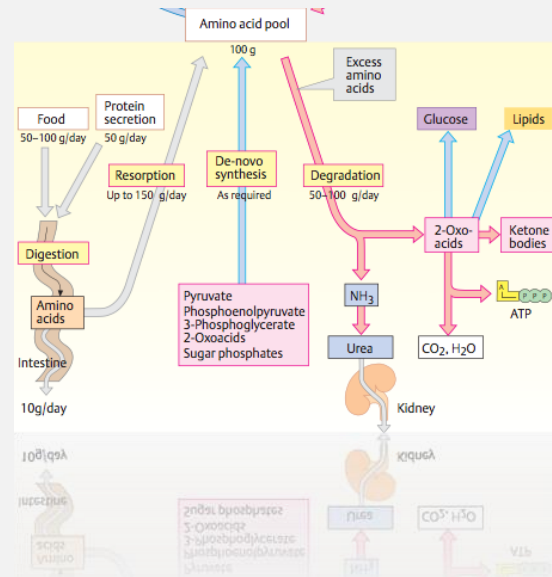
Białka komórkowe ulegają degradacji z różną prędkością:

białka strukturalne są stabilne;

białka metaboliczne mają krótki okres półtrwania;

białka sygnalizacyjne są ekspresjonowane tylko w celu przekazania sygnału;

białka nieprawidłowe muszą być natychmiast



Regulacja degradacji białek

Degradacja białek wymaga działania kilku enzymów w celu całkowitej degradacji białek do ich składowych aminokwasów.

Należą do nich (zlokalizowane nie tylko w układzie pokarmowym ale także w komórkach):

proteinyzy;

peptydazy.

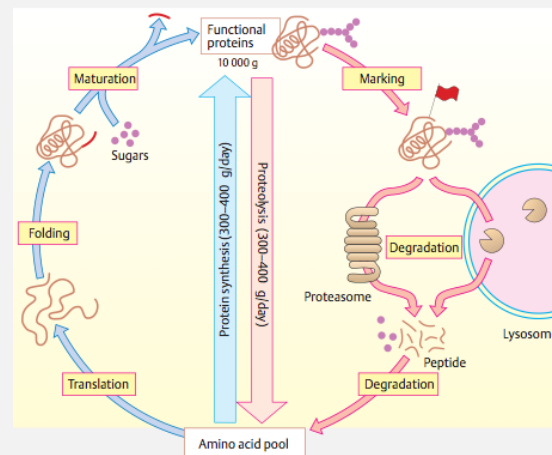
Endopeptydazy to enzymy atakujące wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha.

Exzopeptydazy atakują wiązania peptydowe na końcu łańcucha.

W zależności od mechanizmu działania wyróżnia się peptydazy:

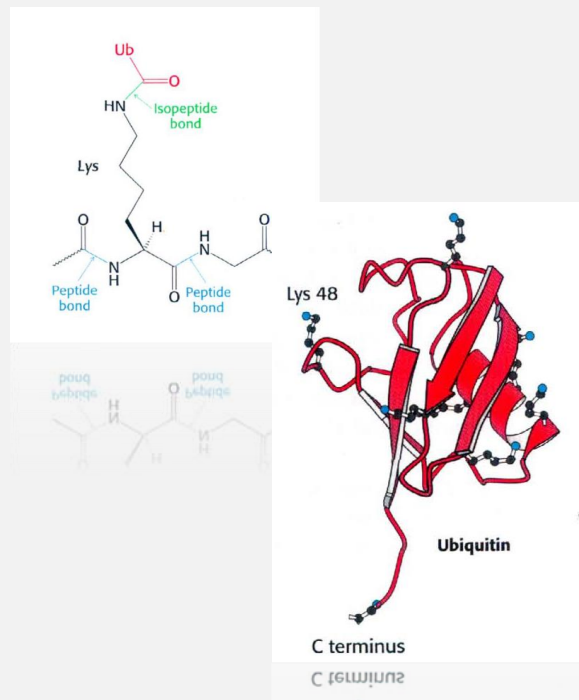
serynowe;

cysteinowe;



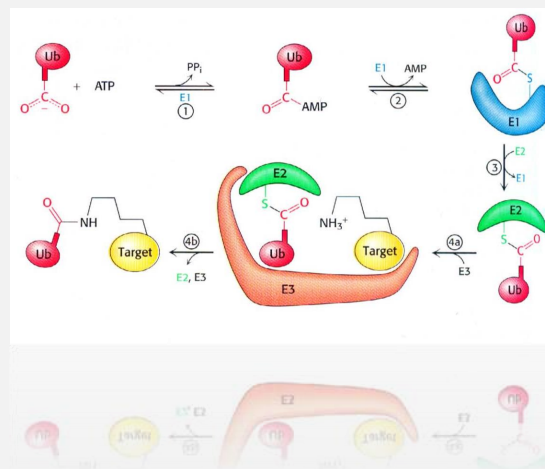
Ubikwitynacja:
to sygnał do degradacji;
jednocześnie... w zależności od
tego w jaki sposób i ile
ubikwityn zostanie
przyłączonych znaczenie sygnału
jest inne;

Lys48 degradacja



Przyłączenie ubikwityny

Ubikwityna to małe białko zawierające 76 aminokwasów;
koniec C ubikwityny jest aktywowany przez stworzenie wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego z bocznym łańcuchem cysteiny z białka E1;
kompleks ten jest przenoszony na cysteinę enzymów E2;
E2 występują w wielocząsteczkowych kompleksach z jeszcze większą liczbą enzymów E3;
kompleksy E2-E3 rozpoznają sygnał degradacji na białku docelowym a reszta ubikwityny zostaje przeniesiona na białko;
przyłączenie do kompleksu kolejnych E1 niosących ubikwitynę powoduje poliubikwitynację;



Okres półtrwania

O okresie półtrwania białek decyduje wiele czynników:

funkcja;

lokalizacja;

sekwencja *N-terminalna*:

reszty destabilizujące to argininy, leucyna (stymulują ubikwitynację);

reszty stabilizujące to metionina, prolina;

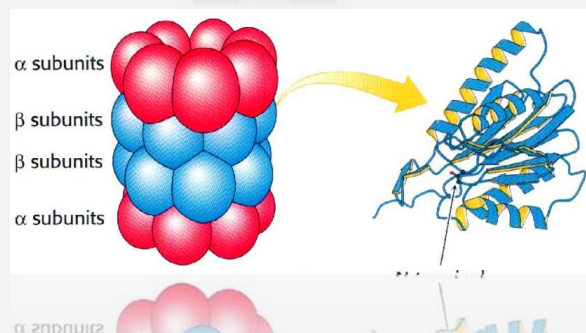
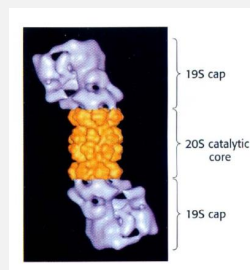
Kaseta destrukcyjna PEST (prolina, kw. glutaminowy, seryna,

Proteasom

Proteasom (Proteasom 26S) to wielopodjednostkowy kompleks o aktywności proteazowej.

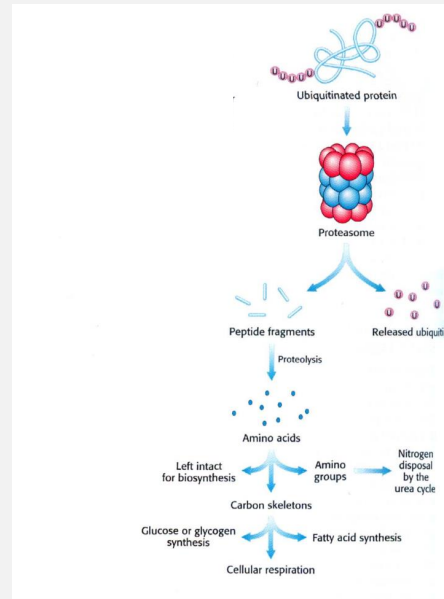
Kompleks 20S (700 kDa) składa się z 14 podjednostek ułożonych w pierścieniu.

Kompleks 19S (*kompleks regulatorowy*) zbudowany jest z 20 podjednostek zawierających liczne ATPasy należące do klasy



Proces degradacji

Ubikwitynowane białka przekształcane są do peptydów.
Znacznik degradacji = ubikwityna, jest w tym procesie usuwany i ponownie wykorzystywany.



Szlak ubikwitynacji

Występuje u wszystkich organizmów eukariotycznych.

Organizmy prokariotyczne dysponują homologami proteosomu, jednak ich funkcja nie jest w pełni zrozumiana.

U *Archei* proteasomy zbudowane są identycznych podjednostek.

Funkcją analogów ubikwityny u prokariotów jest udział w biosyntezie tiaminy.

ThiF jest ho



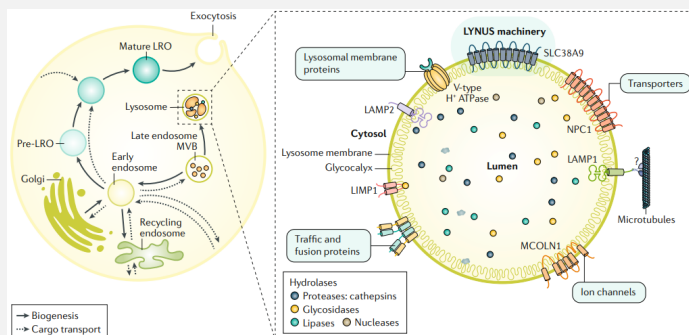
ThiS aktywowane przez ThiF jest przyłączane do cystein

Lizosomalne choroby spichrzeniowe

Lysosomal storage diseases

Frances M. Platt¹*, Alessandra d'Azzo², Beverly L. Davidson^{3,4}, Elizabeth F. Neufeld⁵ and Cynthia J. Tiffit⁶

Abstract | Lysosomal storage diseases (LSDs) are a group of over 70 diseases that are characterized by lysosomal dysfunction, most of which are inherited as autosomal recessive traits. These disorders are individually rare but collectively affect 1 in 5,000 live births. LSDs typically present in infancy and childhood, although adult-onset forms also occur. Most LSDs have a progressive neurodegenerative clinical course, although symptoms in other organ systems are frequent. LSD-associated genes encode different lysosomal proteins, including lysosomal enzymes and lysosomal membrane proteins. The lysosome is the key cellular hub for macromolecule catabolism, recycling and signalling, and defects that impair any of these functions cause the accumulation of undigested or partially digested macromolecules in lysosomes (that is, 'storage') or impair the transport of molecules, which can result in cellular damage. Consequently, the cellular pathogenesis of these diseases is complex and is currently incompletely understood. Several LSDs can be treated with approved, disease-specific therapies that are mostly based on enzyme replacement. However, small-molecule therapies, including substrate reduction and chaperone therapies, have also been developed and are approved for some LSDs, whereas gene therapy and genome editing are at advanced preclinical stages and, for a few disorders, have already progressed to the clinic.



10 faktów o chorobach rzadkich

1. Schorzenie dotykające mniej niż 200 000 osób jest uznawane za rzadkie w USA
2. Znanych jest ponad 7 000 schorzeń
3. 25-30 mln Amerykanów żyje ze schorzeniem rzadkim
4. Wiele z tych schorzeń dotyka dzieci powodując przedwczesną śmierć
5. Wszystkie nowotwory dziecięce traktowane są jako rzadkie i...
6. ... znanych jest ich ponad 500
7. Ponad 90% schorzeń nie ma zatwierdzonych przez FDA leków
8. Nawet 350 mln pacjentów może w skali światowej cierpieć na choroby rzadkie
9. Każdy z nas bez względu na wiek może być dotknięty chorobą rzadką
10. Dzień Chorób Rzadkich (*ang. Rare Disease Day*) – święto obchodzone corocznie, w ostatni dzień lutego.



<https://rarediseases.org/>

Od...



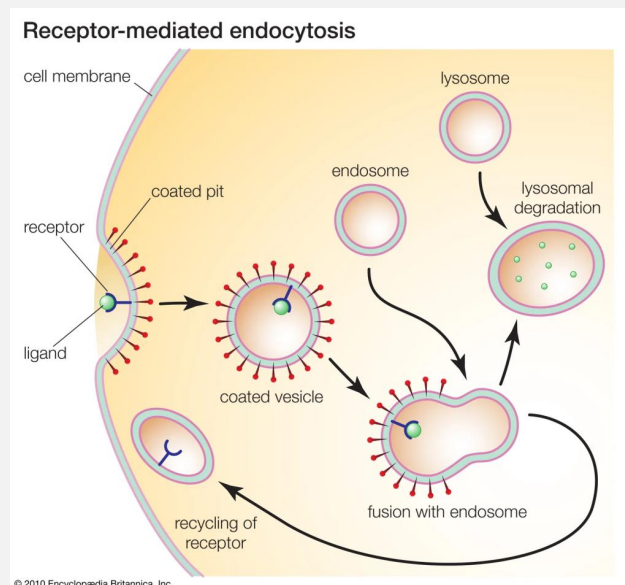
Orphanet: Wiedza dotycząca chorób rzadkich = lepsza opieka

"Choroby rzadkie występują sporadycznie, ale liczba pacjentów z chorobami rzadkimi jest znaczna"

- www.orpha.net
 - Wykaz, klasyfikacje i encyklopedia chorób rzadkich wraz z zaangażowanymi genami
 - Wykaz leków sierocych
 - Katalog organizacji pacjentów
 - Katalog specjalistów i instytucji
 - Katalog centrów eksperckich
 - Katalog laboratoriów medycznych oferujących badania diagnostyczne
 - Katalog projektów badawczych, badań klinicznych, rejestrów i biobanków
 - Zbiór raportów tematycznych

Lysosomal storage disease

- Lizosomalne choroby spichrzeniowe (LCS), choroby lizosomalne, choroby spichrzenia lizosomalnego – grupa chorób uwarunkowanych genetycznie, w których na skutek braku aktywności jednego z enzymów dochodzi do spichrzenia różnych substancji w lizosomach.
- Lizosom – organelum cytoplazmatyczne wytwarzane przez aparat Golgiego, występujące licznie w komórkach eukariotycznych (typowo w komórkach zwierzęcych) i komórkach roślinnych, natomiast nieobecne w komórkach prokariotycznych.
 - Są to niewielkie pecherzyki o średnicy ok. 0,5 μm (rzadko 0,1–1 μm), otoczone pojedynczą błoną lipidowo-białkową o grubości ok. 7 nm.
 - Zawierają kwaśne hydrolazy rozkładające białka, kwasy nukleinowe, węglowodany i tłuszcze.
 - pH wewnątrz lizosomu ma wartość optymalną dla występujących w nim enzymów, równą około 5.
- Wikipedia, maj 2023



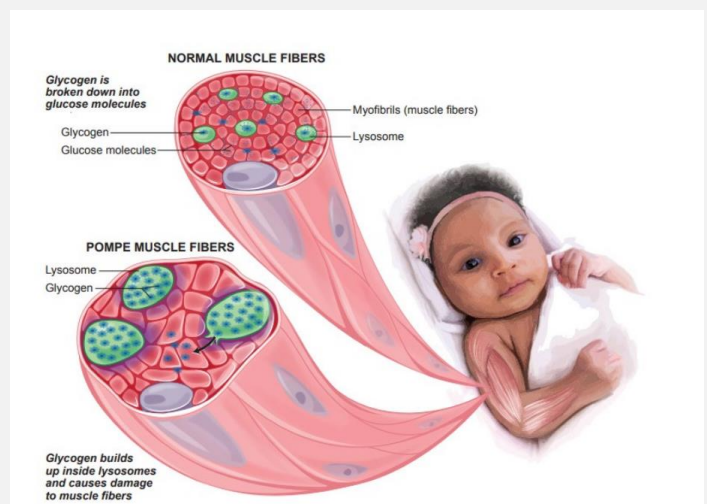
Dystrybucja w populacji

Disorder	Region or population	Incidence (per 100,000 individuals)
Gaucher disease type I	Ashkenazi Jews	100 (REF. ⁹)
Tay–Sachs disease (infantile)	Ashkenazi Jews	25 (REF. ¹¹⁴)
Niemann–Pick disease type A	Ashkenazi Jews	2.5 (REF. ⁹)
GM1 gangliosidosis	Rudari isolate	10 (REF. ¹⁹⁸)
Metachromatic leukodystrophy	Western Navajo Nation	40 (REF. ¹⁹⁹)
Pompe disease	The Netherlands	2.5 (REF. ²⁰⁰)
Cystinosis	Brittany	3.8 (REF. ²⁰¹)
Salla disease	Finland or Sweden	2.5 (REF. ²⁰²)
Aspartylglucosaminuria	Finland	54 (REF. ¹²)
Niemann–Pick disease type C	Nova Scotia (French Acadian)	100 (REF. ²⁰³)
Fabry disease	Nova Scotia	9.3*
Hermansky–Pudlak (types 1 and 3)	Puerto Rico	56 (REFS. ^{13,14})

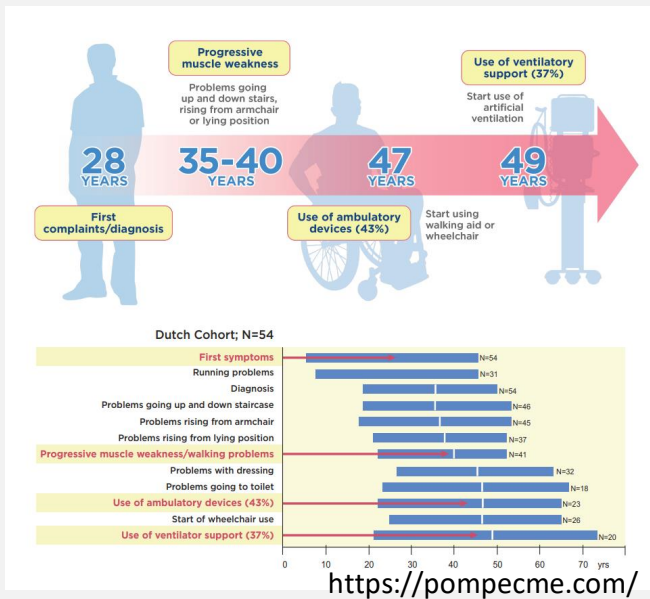
*M. West, personal communication. GM1, GM1-ganglioside; LSD, lysosomal storage disease.

Choroba Pompego

- Choroba Pompego (glikogenoza typu II, GSD II, ang. Pompe's disease) – rzadka choroba genetyczna, dziedziczona w sposób autosomalny recesywny, polegająca na braku enzymu – α -glukozydazy (kwaśnej maltazy). Efektem tego jest zaburzenie spichrzenia glikogenu w organizmie, przy czym nie występują znaczące zaburzenia metabolizmu węglowodanów i epizody hipoglikemii.
- Należy do grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych.
- Została po raz pierwszy opisana w 1932 roku przez holenderskiego patologa Joannesa Cassianusa Pompego.

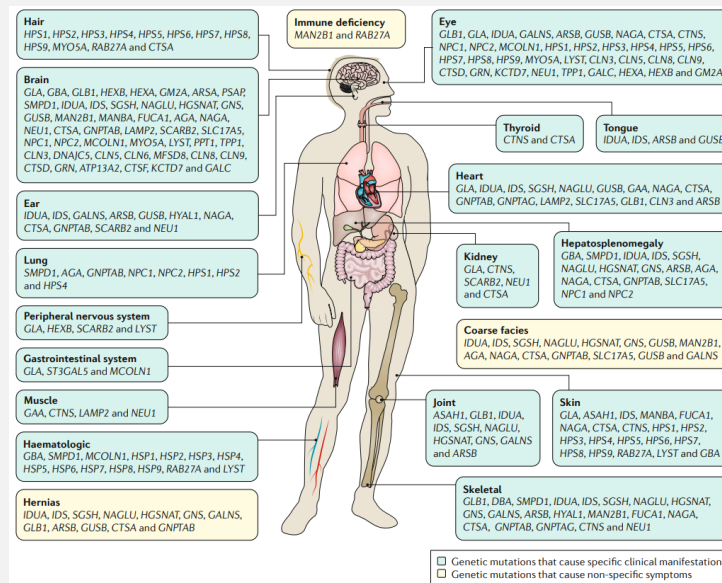


Rokowania

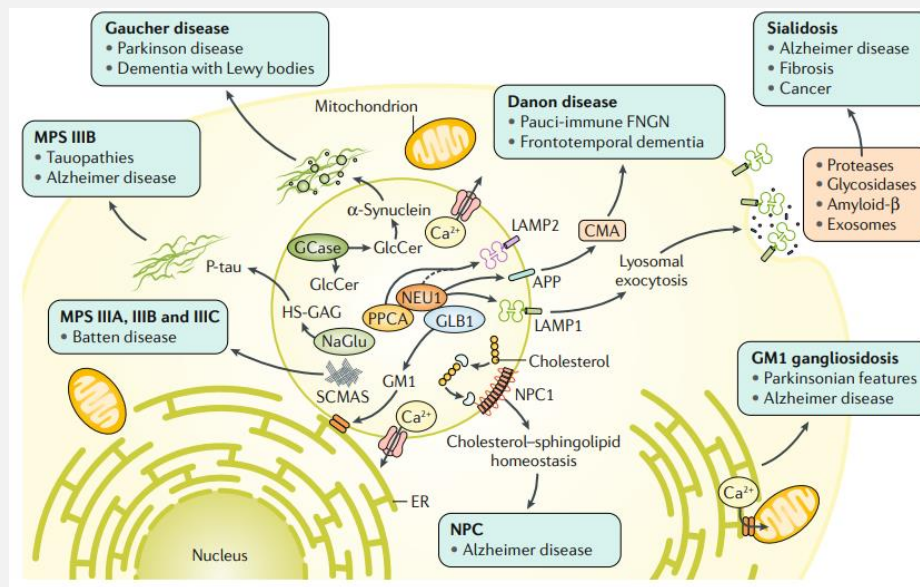


- W zależności od momentu wystąpienia objawów chorobę Pompego możemy podzielić na trzy typy:
 - postać dziecięcą
 - aktywność enzymu poniżej 1%
 - objawy: hipotonia mięśniowa, słabość mięśniowa, kardiomegalia, niewydolność serca, obecność dużego języka i wczesny zgon
 - postać młodzieńczą
 - aktywność enzymu poniżej 10%
 - objawy: postępujące osłabienie mięśni
 - postać u dorosłych
 - aktywność enzymu poniżej 40%
 - objawy: postępujące osłabienie mięśni, niewydolność oddechu, podwyższone stężenie enzymów wątrobowych

Objawy

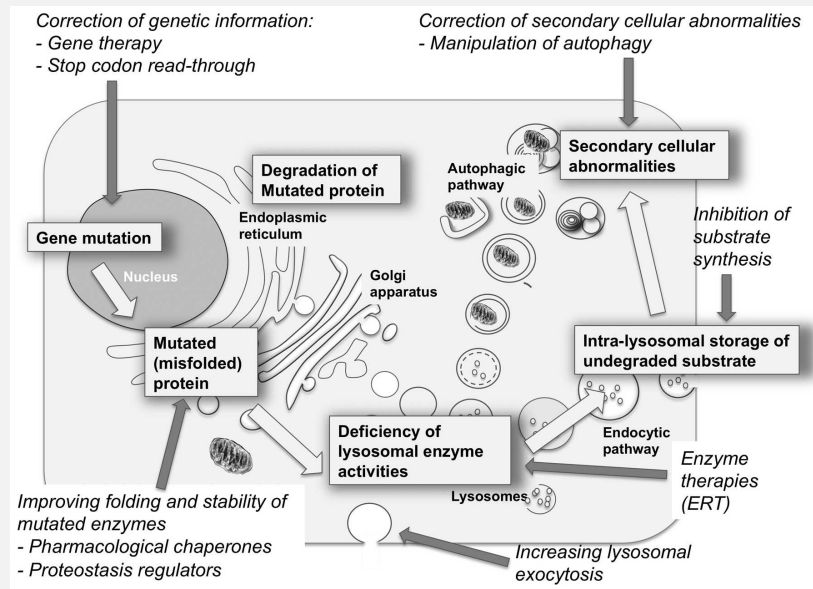


Objawy

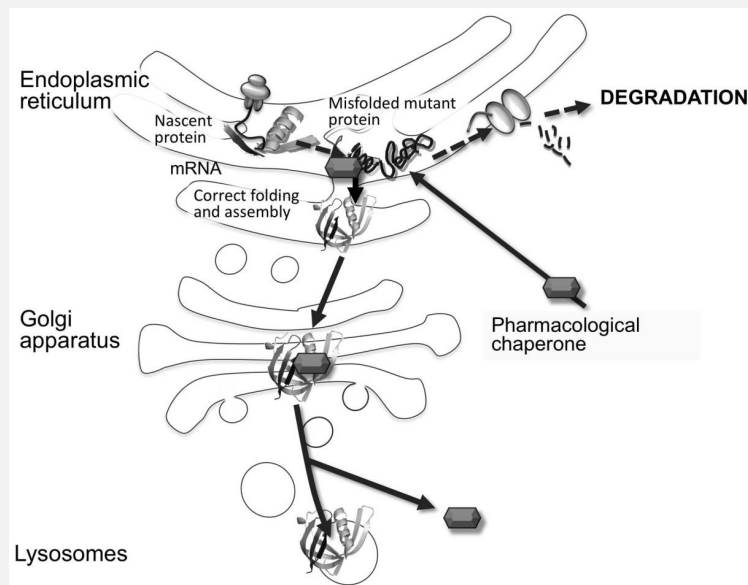


Strategie

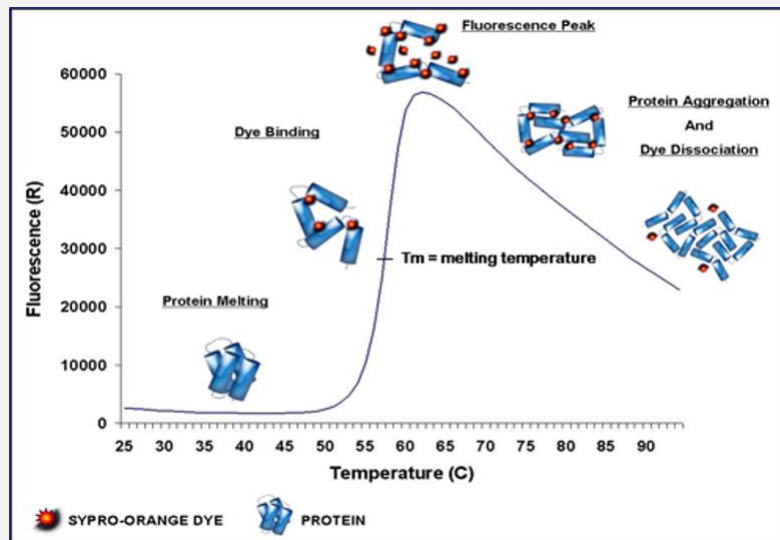
- The most obvious approach to correct loss-of-function diseases, such as LSDs, caused in most cases by the deficiency of a lysosomal hydrolase, is to restore or replace the defective enzymatic activity. Thus, the majority of the approaches thus far developed to treat LSDs are aimed at increasing the cell and tissue levels of the missing enzyme. These include:
 - hematopoietic stem cell transplantation (HSCT),
 - enzyme replacement therapy (ERT),
 - pharmacological chaperone therapy (PCT),
 - gene therapy (GT).



PCT

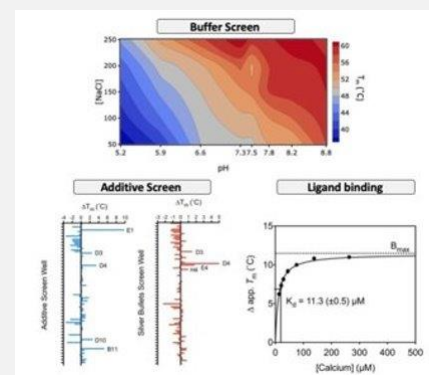


Thermofluor (DSF)

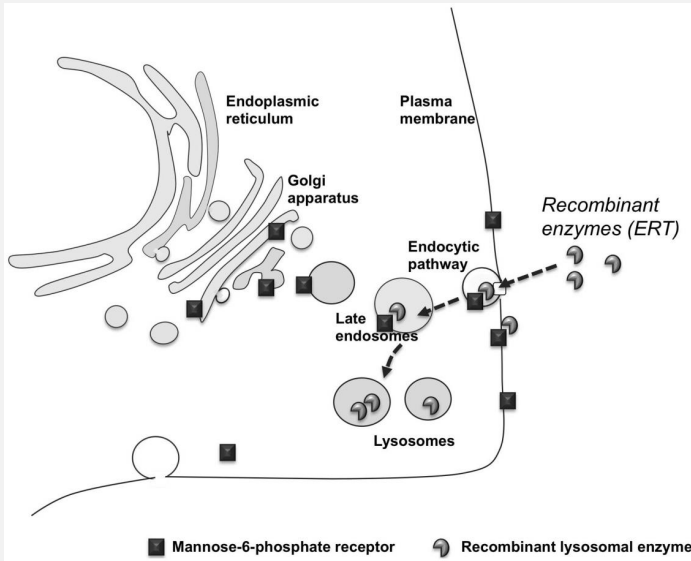


DSF

- Label-free drug screening
- Drug lead optimization
- Studies of enzyme mechanism
- Protein stabilization for optimized isolation
- Characterization of engineered proteins
- Screening for inhibitors of protein-protein interactions of modulators of protein conformational changes
- Deciphering proteins of unknown biological function[edit]
- The biochemical function of protein targets identified through gene
- Optimization of protein crystallization conditions

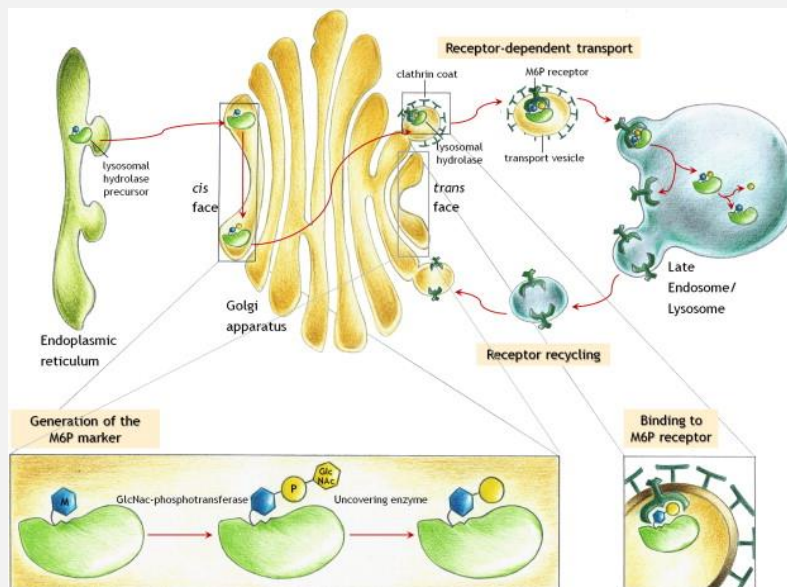


ERT



- The rationale of ERT evolved from pivotal studies on the molecular and cellular mechanisms implicated in the sorting of newly synthesized and secreted lysosomal enzymes.
- These studies showed that lysosomal hydrolases are delivered to lysosomes through the mannose or the mannose-6-phosphate receptor pathways and that these receptors are also expressed at the plasma membrane of cells. Thus, the lysosomal enzymes can be internalized by cells and follow the endocytic route to be correctly delivered to lysosomes, by binding to the receptors exposed on the cellular membrane. Based on these studies, it has become evident that the same route could be exploited to deliver recombinant enzymes to defective cells and tissues and that LSDs represented the best model of inherited metabolic disorders that could be treated by providing the missing enzyme from external sources.

Leczenie



<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.012>

Disease	Type of therapy	Drug name	Comments
Gaucher disease	Recombinant enzyme*	*Imiglucerase *Velaglucerase alfa *Taliglucerase alfa	ERT is effective only for type I Gaucher disease (the non-neuronopathic phenotype) and is not effective for types II and III (neuronopathic phenotypes)
	Substrate reduction therapy	*Miglustat *Eliglustat	Effective only for non-neuronopathic Gaucher disease
Fabry disease	Recombinant enzyme	*Agalsidase beta *Agalsidase alfa	*Agalsidase alfa and beta have the same amino acid composition but different glycosylation *Agalsidase beta was approved by the US FDA, although both drugs are approved by the EMA
	Chaperone therapy	Migalastat	Active site inhibitor and/or chaperone
Pompe disease	Recombinant enzyme	Alglucosidase alfa	Reverses cardiac but not skeletal muscle abnormalities in Pompe disease and is approved by the EMA
MPS I (Hurler-Scheie and Scheie syndromes)	Recombinant enzyme	Laronidase	Effective for attenuated forms of MPS I (Hurler-Scheie and Scheie syndromes) but is not effective for severe form of MPS I (Hurler syndrome)
MPS II (Hunter syndrome)	Recombinant enzyme	*Idursulfase *Idursulfase beta	* Not effective for CNS or skeletal disease *Idursulfase beta approval by Korean Ministry of Food and Drug Safety
MPS VI (Maroteaux-Lamy syndrome)	Recombinant enzyme	Galsulfase	Efficacy variable and depends on the severity of the disease and the age at which ERT was started
MPS IV (Morquio syndrome A)	Recombinant enzyme	Elosulfase	Not effective on bone disease, which might need surgical intervention
MPS VII (Sly syndrome)	Recombinant enzyme	Vestronidase alfa	Approved for use in paediatric and adult patients
Lysosomal acid lipase deficiency	Recombinant enzyme	Sebelipase alfa	Multiple disease-related lipid abnormalities reduced
Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2 disease)	Recombinant enzyme	Cerliponase alfa	First treatment available for any form of Batten disease; requires intracerebroventricular administration
Niemann-Pick disease type C	Substrate reduction therapy	Miglustat	First small-molecule modifier of CNS disease in an LSD

CNS, central nervous system; EMA, European Medicines Agency; ERT, enzyme replacement therapy; LSD, lysosomal storage disease; MPS, mucopolysaccharidosis.
*The names of the recombinant enzymes represent the generic name. The use of α and β in the name of the natural enzyme is to distinguish between different preparations of the recombinant enzymes.

Disease	Type of therapy	Drug name or procedure	Clinical trial number examples
α -Mannosidosis	Recombinant enzyme	rhLAMAN Velmanase alfa	EudraCT Number: 2016-001988-36
Niemann-Pick disease type B	Recombinant enzyme	rhASM Olipudase alfa	NCT02004691
Niemann-Pick disease type C	Proteostasis modifier	Arimoclomol	NCT02612129
	Disease-specific	Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (VTS 720)	NCT02534844
Metachromatic leukodystrophy	Recombinant enzyme	rhASA	NCT01887938
	Gene therapy	LV/ARSA-transduced HSC transplantation	NCT01560182
	Gene therapy	LV/ARSA/ABCD1 transduced autologous HSC transplantation	NCT02559830
	Gene therapy	Intracerebral AAVrh.10cuARSA	NCT01801709
MPS I	Gene therapy	Intravenous AAV/SB-318-IDUA	NCT02702115
	Anti-inflammatory	Adalimumab	NCT03153319
MPS II	Anti-inflammatory	Adalimumab	NCT03153319
	Gene therapy	AAV/SB-913-ID5	NCT03041324
MPS IIIA (Sanfilippo syndrome A)	Recombinant enzyme	rhHNS	NCT01299727
	Gene therapy	Intravenous scAAV9.U1a.hSGSH	NCT02716246
MPS IIIB (Sanfilippo syndrome B)	Recombinant enzyme	BMN250	NCT02754076
	Substrate reduction therapy	Genistein	EudraCT: 2013-001479-18
	Gene therapy	Intracerebral rAAV2/5-hNAGLU	NCT03300453
	Gene therapy	Intravenous rAAV9.CMV.hNAGLU	NCT03315182
MPS VI	Gene therapy	AAV2/8.TBG.hARSB	NCT03173521
Fabry disease	Substrate reduction therapy	Lucerastat	NCT02930655
	Substrate reduction therapy	Ibiglustat	NCT02228460
	Gene therapy	LV galactosidase- α -transduced stem cells	NCT02228460
Gaucher disease	Substrate reduction therapy	Ibiglustat	NCT02843035
	Chaperone therapy	Ambroxol	NCT01463215
Pompe disease	Gene therapy	Intramuscular AAV9-DES-HGAA	NCT02240407
Tay-Sachs and Sandhoff disease	Chaperone therapy	Pyrimethamine	NCT01102686

Trials are listed on publicly available databases and are available at ClinicalTrials.gov; AAV, adeno-associated virus; ARSA, arylsulfatase A; HSC, haematopoietic stem cell; LSD, lysosomal storage disease; LV, lentivirus; MPS, mucopolysaccharidosis.

Imiglucerase

Open Access Full Text Article

REVIEW

Imiglucerase in the treatment of Gaucher disease: a history and perspective

Patrick B Deegan
Timothy M Cox

Department of Medicine, University of Cambridge, LysoSOM Disorders Unit, Addenbrooke's NHS Foundation Hospitals Trust, Cambridge, UK

Abstract: The scientific and therapeutic development of imiglucerase (Cerezyme®) by the Genzyme Corporation is a paradigm case for a critical examination of current trends in biotechnology. In this article the authors argue that contemporary interest in treatments for rare diseases by major pharmaceutical companies stems in large part from an exception among rarities: the astonishing commercial success of Cerezyme. The fortunes of the Genzyme Corporation, latterly acquired by global giant Sanofi SA, were founded on the evolution of a blockbuster therapy for a single but, as it turns out, propitious ultra-orphan disorder: Gaucher disease.

Keywords: enzyme therapy, ultra-orphan, macrophage targeting, lysosomal disease, mannose lectin, biopharmaceutical

Find your protein

UniProtKB Advanced | List Search

Examples: Insulin, APP, Human, P05067, organism_id:9606

UniProt is the world's leading high-quality, comprehensive and freely accessible resource of protein sequence and functional information. [Cite UniProt](#)

Proteins UniProt Knowledgebase

Reviewed (Swiss-Prot) 569,516	Unreviewed (TrEMBL) 249,308,459
----------------------------------	------------------------------------

Species Proteomes

Protein sets for species with sequenced genomes from across the tree of life

Protein Clusters UniRef

Clusters of protein sequences at 100%, 90% & 50% identity

Sequence Archive UniParc

Non-redundant archive of publicly available protein sequences seen across different databases

Disease - Glycogen storage disease 2

Download View proteins

Definition	A metabolic disorder with a broad clinical spectrum. The severe infantile form, or Pompe disease, presents at birth with massive accumulation of glycogen in muscle, heart and liver. Cardiomyopathy and muscular hypotonia are the cardinal features of this form whose life expectancy is less than two years. The juvenile and adult forms present as limb-girdle muscular dystrophy beginning in the lower limbs. Final outcome depends on respiratory muscle failure. Patients with the adult form can be free of clinical symptoms for most of their life but finally develop a slowly progressive myopathy.
Acronym	GSD2
Alternative names	Acid alpha-glucosidase deficiency Acid maltase deficiency Alpha-1,4-glucosidase deficiency AMD Cardiomegalia glycoenica 7 more alternative names
Keywords	Glycogen storage disease
Cross references	MIM: 232300 (phenotype) MedGen: C0017921 MedGen: C2931347 MedGen: C068791 MedGen: C068792 MeSH: D006009

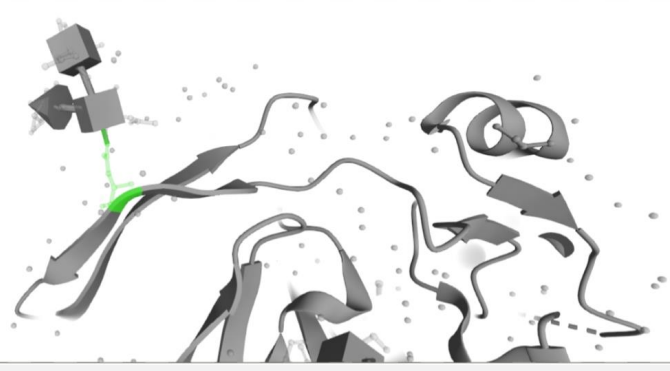
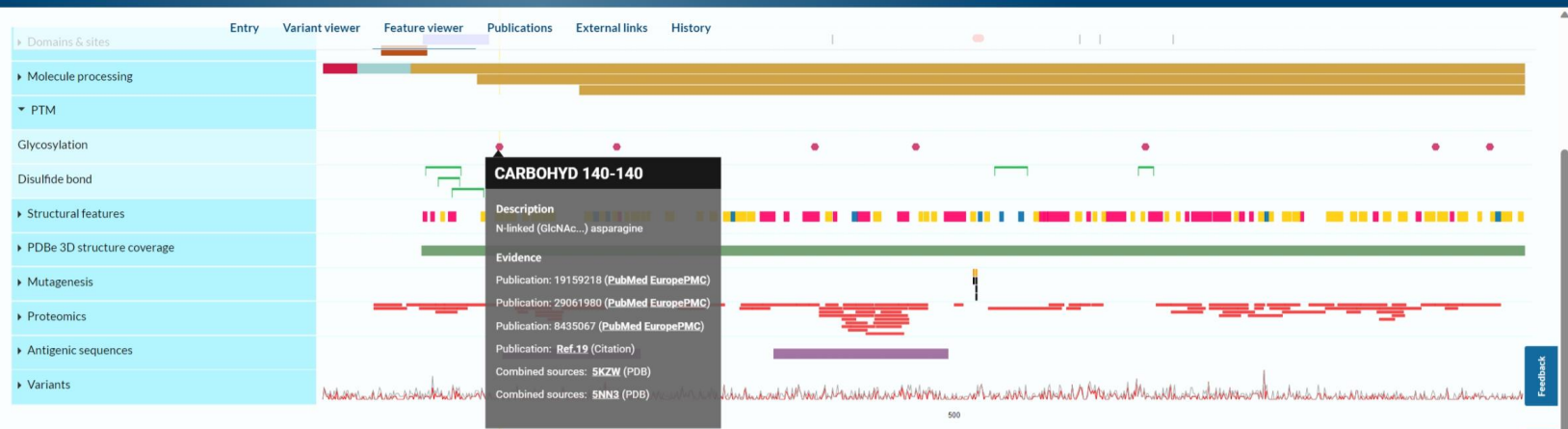
Disclaimer

Any medical or genetic information present in this entry is provided for research, educational and informational purposes only. It is not in any way intended to be used as a substitute for professional medical advice, diagnosis, treatment or care. Our staff consists of biologists and biochemists that are not trained to give medical advice.

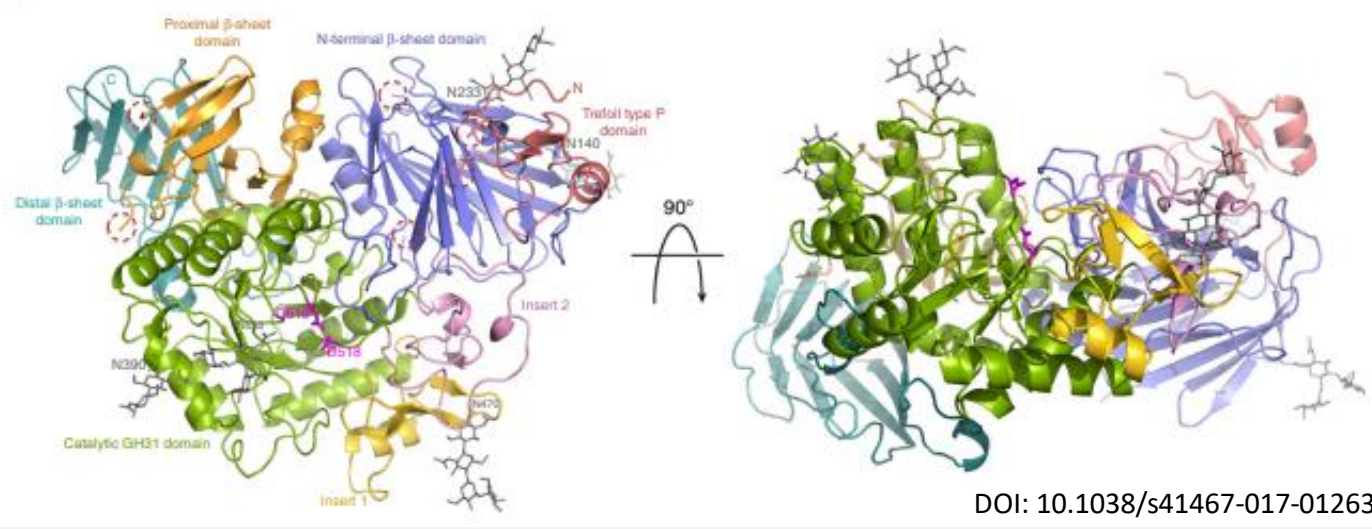
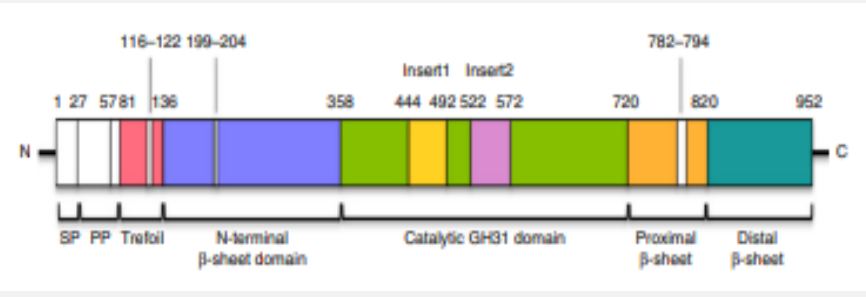
Related UniProtKB entry

Browse 1 entry

P10253 · LYAG_HUMAN
 Lysosomal alpha-glucosidase - Gene: GAA · Homo sapiens (Human) - EC:3.2.1.20 · 952 amino acids · Evidence at protein level · Annotation score: 6/5
 #Glycosidase #Hydrolase #Disease variant #Glycogen storage disease
 1 domain · 165 reviewed variants · 2 active sites · 1 disease · 93D structures · 62 reviewed publications



α -glukozydaza



Inżynieria

- Działalność polegająca na projektowaniu, konstrukcji, modyfikacji i utrzymaniu efektywnych kosztowo rozwiązań dla praktycznych problemów, z wykorzystaniem wiedzy naukowej oraz technicznej. Działalność ta wymaga rozwiązywania problemów różnej natury oraz skali. Bardziej ogólnie, inżynieria zajmuje się też rozwojem technologii.
 - '... projektowaniu, konstrukcji, modyfikacji' białek i enzymów.
 - '... z wykorzystaniem wiedzy naukowej oraz technicznej', tj. metod opartych o narzędzia bioinformatyczne.
 - '... rozwiązywania problemów różnej natury oraz skali', tj. utrzymanie integralności strukturalnej i/lub modyfikacja aktywności enzymatycznych.

Podjęcie klasyczne...

- Synteza nowo zaprojektowanych białek poprzez wykorzystanie technologii rekombinowanego DNA i chemiczną syntezę kwasów nukleinowych.



Podójście współczesne...

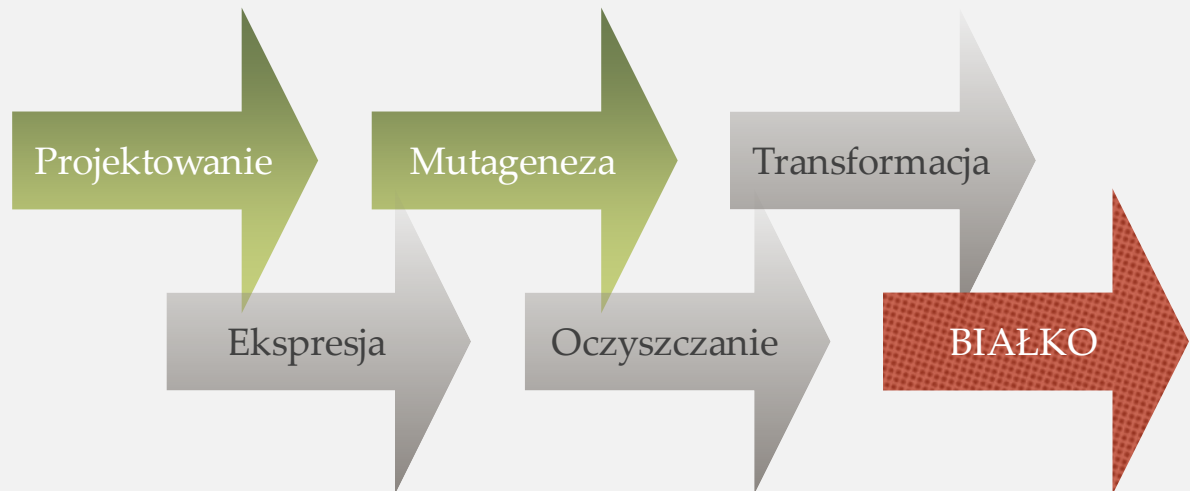
- Fałdowanie białek – proces fałdowania, chaperony, białka patologiczne.
- Dynamika białek – analiza struktury, analiza dynamiki.
- Modelowanie konformacji białek.
- Chemiczna synteza polipeptydów.
- Projektowanie modyfikacji białek.



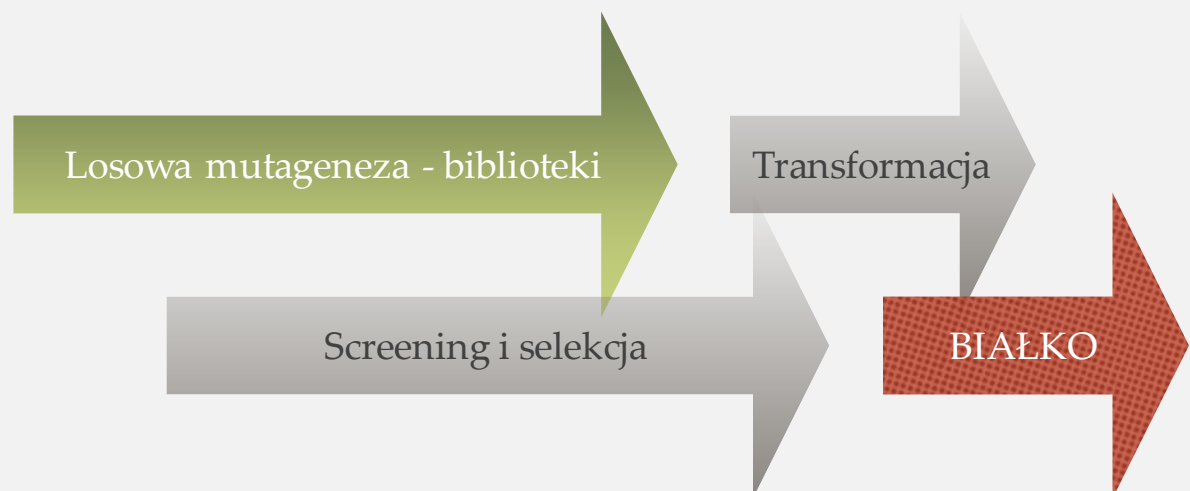
Możliwości...

- pozwala na zmiany i optymalizację kluczowych właściwości białek:
 - stabilności
 - selektywności
 - powinowactwa
 - aktywności
 - odporności na degradację proteolityczną
 - rozpuszczalność
 - poziom „ekspresji”
- dzięki metodom inżynierii można wyizolować pojedyncze funkcjonalne domeny (najmniejsze aktywne fragmenty) z
 - wielodomennych białek
 - opornych na hydrolizę
 - słabo rozpuszczalnych
 - mieszaniny sfałdowanych/ lokalnie niesfałdowanych/ niesfałdowanych
- metody powodujące wzrost rozpuszczalności, stabilności i zdolności do krystalizacji mogą pozwolić na wykorzystanie technologii upakowania (compaction technology) opartej na usuwaniu z białka nie-kluczowych luźnych pętli – w rezultacie otrzymuje się mini-białka o lepszych właściwościach terapeutycznych (białka terapeutyczne, przeciwciała). Techniki te wykorzystuje się do rozwoju szczepionek antywirusowych i w badaniach nad lekami przeciwko bakteriom

Ulepszony enzym...



Ulepszony enzym...



Poprawianie stabilności

Na stabilność białka wpływają:

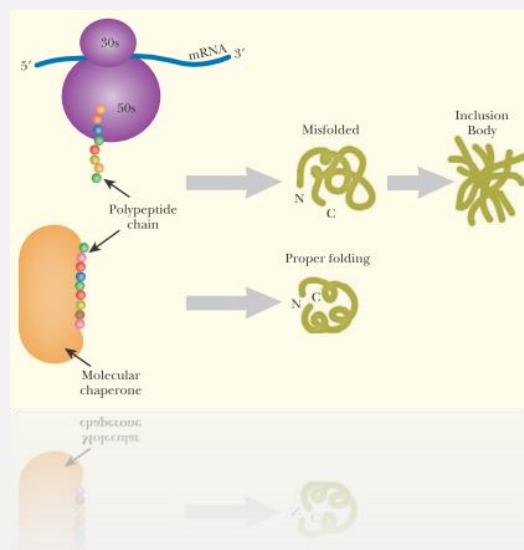
- aminokwas N końcowy (Met, Gly, Ala, itp. długie życie; Leu, Phe, Lys, itp. krótkie życie)
- sekwencje *PEST* destabilizujące – sekwencje 10-60 AA w środku białka bogate w Pro, Glu, Ser i Thr – one są rozpoznawane przez enzymy proteolityczne
- najprościej zmienić aminokwas *N*-końcowy – wystarczy go dodać np. w trakcie PCR insertu
- znacznie trudniej zmienić sekwencje *PEST* nie wpływając na funkcję białka
- czasami podniesienie stabilności białka powoduje, że zaczyna się ono nieprawidłowo fałdować, co przy dużej nadekspresji prowadzi do powstania ciałek inkluzyjnych

Table 10.2 N-Terminal Rule for Protein Stability

N-Terminal Residue	Approximate Half-Life (Minutes)
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	120
Ile, Glu, Tyr	30
Gln, Pro	10
Leu, Phe, Asp, Lys, Arg	2-3
Protein: $\text{Phe}^1 \text{Met}^2 \text{Gly}^3 \text{Val}^4 \text{Leu}^5$	5-9
Protein: $\text{Met}^1 \text{Gly}^2$	10

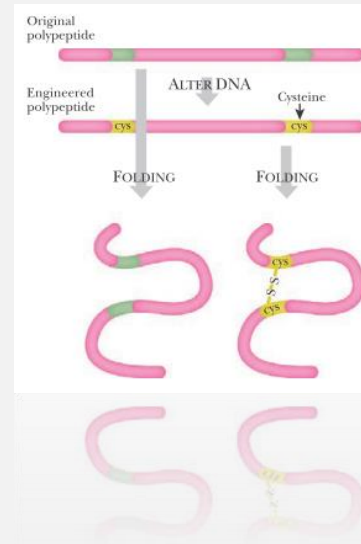
Poprawianie stabilności

- pojawianie się ciałek inkluzyjnych oznacza najczęściej, że produkowane białko jest słabo rozpuszczalne lub produkowane zbyt szybko
- w takiej sytuacji najlepiej wprowadzić do systemu dodatkowe czaperony, które zapewnią prawidłowe fałdowanie



Poprawianie stabilności

- mostki dwusiarczkowe nie tylko determinują strukturę trójwymiarową białka, zapewniają także jego stabilność i podnoszą odporność na utlenianie (co w warunkach przemysłowych czyli pozakomórkowych jest bardzo istotne) – wprowadzenie dodatkowych mostków podnosi stabilność białka
- wprowadza się dodatkowe cysteiny, które w warunkach utleniających utworzą mostek – oczywiście konieczna jest znajomość czwartorzędowej struktury białka, żeby wprowadzić te aminokwasy w odpowiednie miejsca
- zasadniczo im dłuższą pętlę tworzy mostek, tym bardziej podnosi się stabilność



Poprawianie stabilności

- mostki dwusiarczkowe nie tylko determinują strukturę trójwymiarową białka, zapewniają także jego stabilność i podnoszą odporność na utlenianie (co w warunkach przemysłowych czyli pozakomórkowych jest bardzo istotne) – wprowadzenie dodatkowych mostków podnosi stabilność białka
- wprowadza się dodatkowe cysteiny, które w warunkach utleniających utworzą mostek – oczywiście konieczna jest znajomość czwartorzędowej struktury białka, żeby wprowadzić te aminokwasy w odpowiednie miejsca
- zasadniczo im dłuższą pętlę tworzy mostek, tym bardziej podnosi się stabilność

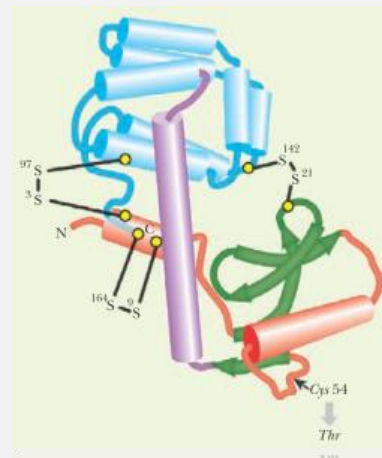
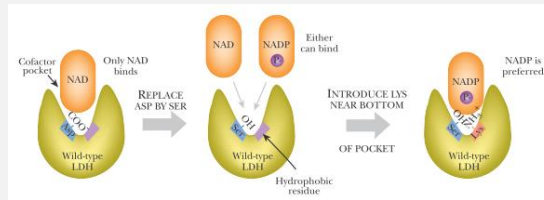


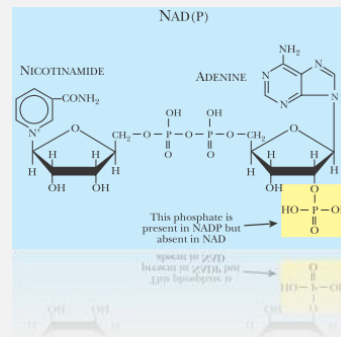
Table 11.2 Disulfide Stabilization of T4 Lysozyme

Protein	Disulfide Bonds Present			Stability as T _m	Activity (%)
	3-97	9-164	21-142		
Original	-	-	-	41.9	100
1	+	-	-	46.7	96
2	-	+	-	48.3	106
3	-	-	+	52.9	0
4	+	+	-	57.6	95
5	-	+	+	58.9	0
6	+	+	+	65.5	0

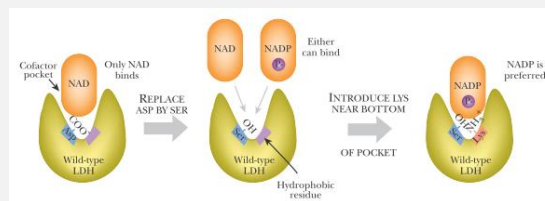
Miejsce aktywne



- można zmienić także miejsce aktywne enzymu i zmienić specyficzność wiązania substratu albo kofaktora
- przykład enzymy z grupy dehydrogenaz, które mają kofaktory NAD lub NADP – mają podobny mechanizm, ale NAD jest używany przez enzymy szlaków degradacji i w łańcuchu oddechowym, natomiast NADP w reakcjach syntezy
- strukturalnie różnią się tylko grupą fosforanową przyłączoną do pierścienia rybozy NADP – powoduje to że NADP ma bardziej ujemny ładunek a enzymy, które go „używają” mają większe kieszenie wiążące z dodatnio naładowanymi aminokwasami.



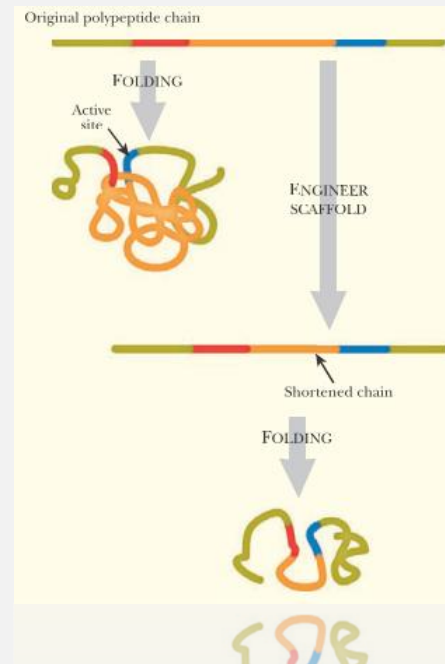
Miejsce aktywne



- dehydrogenaza mleczanowa większości bakterii używa NAD ale nie NADP, w reakcji przekształcania pirogronianu w mleczan
- w miejscu wiązania kofaktora znajduje się ujemnie naładowany asparaginian (co wyklucza wiązanie NADP) – jeżeli zamieni się go na obojętny (np Ser) enzym będzie mógł związać oba kofaktory. Jeżeli zmienimy hydrofobowy AA w pobliżu kieszeni na dodatnio naładowany (Lys lub Arg) enzym będzie preferował NADP
- podobnie można zmienić miejsce wiązania substratu – np. jeżeli zamienimy trzy Ala na 3 Gly – miejsce zrobi się większe i będzie mogło związać cząsteczkę większą niż pirogronian. Jeżeli zamienimy reszty hydrofilowe (Lys i Gln) na hydrofobowe (Val, Met) miejsce stanie się bardziej hydrofobowe, Udowodniono, że 5 i 6 węglowe związki mogą być substratami

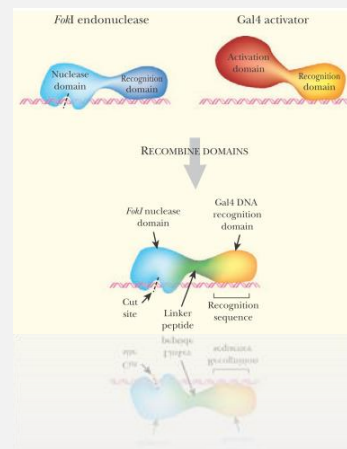
Zmiana architektury

- w enzymach miejsce aktywne buduje stosunkowo niewiele AA
- pozostałe stanowią trójwymiarowe rusztowanie odpowiedzialne za to, żeby odpowiednie reszty znalazły się w odpowiednim miejscu w przestrzeni
- bardzo często takie rusztowanie jest znacznie większe niż trzeba – np. β galaktozydaza z *E. coli* ma ok. 1000 AA, podczas gdy najmniejsze enzymy hydrolityczne mają ok. 200-300 AA, co oznacza, że teoretycznie białko to mogłoby być znacznie mniejsze co z przemysłowego punktu widzenia byłoby bardzo korzystne
- metodami typu phage display wybiera się krótkie fragmenty białka o określonej funkcji a resztę usuwa



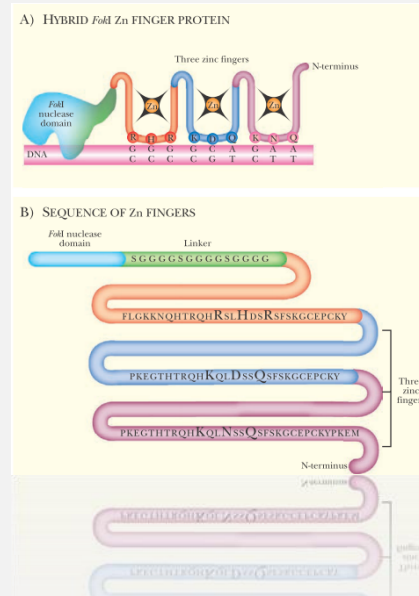
Rekombinacja domen

- łączy się domeny funkcjonalne z różnych białek
- enzymy restrykcyjne - połączenie domeny tnącej Fok I z inną sekwencyjnie specyficzną domeną wiążącą DNA. Fok I jest enzymem restrykcyjnym II typu z domenami N końcową (rozpoznawanie sekwencji DNA) i C końcową (cięcie DNA). Sama domena endonukleazowa tnie niespecyficznie, ale jeżeli połączy się ją z domeną rozpoznającą sekwencję, to ona będzie determinować specyficzność ciętej sekwencji
- białko Gal4 jest aktywatorem transkrypcji u drożdży. Ma domenę aktywującą i rozpoznającą 15 pz sekwencję konsensusową. Jeżeli połączymy ostatnie 17 AA koniec Gal4 z domeną tnącą Fok I powstanie białko hybrydowe wiążące się do sekwencji rozpoznawanej przez Gal4 i przecinające DNA w tym miejscu



Rekombinacja domen

- ▶ domenę tnącą z Fok I łączono także z domenami typu palca cynkowego (białko może mieć wiele palców, każdy wiąże trzy pary zasad)
- ▶ przykład – 90 AA domena z trzema palcami rozpoznająca specyficjnie 9 pz połączona z domeną nukleazową Fok I



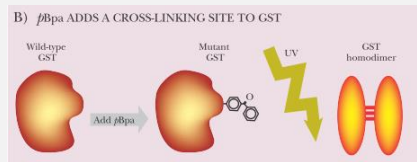
Rekombinacja domen



Phusion DNA Polymerase

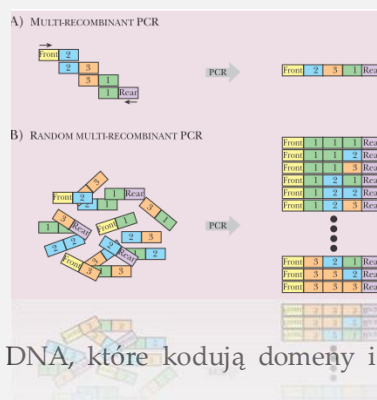
Oprócz klasycznej domeny odpowiedzialnej za powielanie/kopiowanie DNA zawiera dodatkową domenę odpowiedzialną za wiązanie. W wyniku tego polymeraza stabilniej wiąże się z szablone.

Modyfikacja AA



- ▶ nienaturalne aminokwasy mają wiele różnych grup, np p-benzoilo-L-fenyloalaniny w jedną pozycję enzymu S-transferazy glutationu, powoduje dimeryzację enzymu pod wpływem światła UV
- ▶ w skali laboratoryjnej izoluje się tRNA i podłącza do nich nienaturalne AA a następnie dostarcza do sztucznego systemu translacyjnego
- ▶ na skalę przemysłową używa się transgenicznych komórek, które mają już tRNA dla dziwnych AA – najczęściej po prostu tworzy się tRNA wstawiające aminokwas w jeden z kodonów stop

Biblioteki



- ▶ znane są miliony sekwencji DNA, które kodują domeny i segmenty białek o określonych funkcjach
- ▶ można też zaprojektować zupełnie nową domenę i zsyntetyzować sztucznie kodującą ją DNA
- ▶ fragmenty DNA długości ok. 75 pz (25 AA) łączy się razem techniką PCR stosując odpowiednio przygotowane zachodzące na siebie stratory
- ▶ różne fragmenty można łączyć w sposób zaplanowany [A] lub zupełnie przypadkowy [B] dodanie sekwencji promotorowych i terminalnych spowoduje, że powstanie gen kodujący nie istniejące w przyrodzie białko – należy przeprowadzić screening, sprawdzić aktywność, wiązanie ligandów itp

Systemy ekspresji

- białka rekombinowane można produkować w wielu systemach – bakteryjnych, drożdżowych, w roślinach, zwierzętach, komórkach ssaczy lub owadziach
- wybór systemu uzależniony jest od tego jakie białko chcemy produkować – np jeżeli białko ma mieć modyfikacje potranslacyjne albo ma strukturę, której nie jest w stanie samo przybrać to w przedbiegach odpadają bakterie

Charakterystyka organizmów wykorzystywanych do produkcji białek rekombinowanych

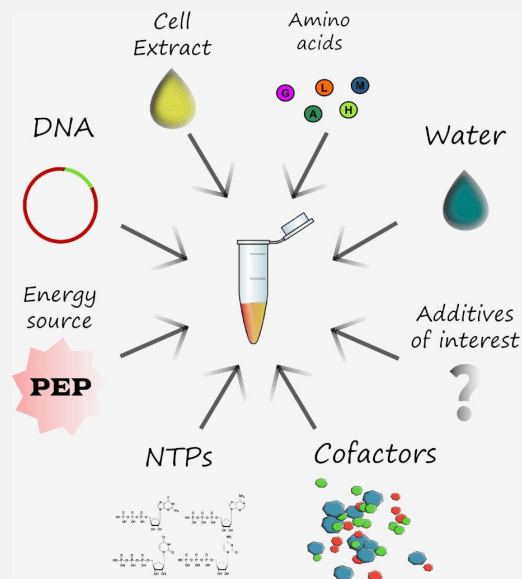
Characteristics	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Growth speed	Fast ($T_d \sim 20\text{-}30$ min)	Fast ($T_d \sim 90$ min)	Slow ($T_d \sim 24\text{-}30$ h)	Slow ($T_d \sim 24\text{-}30$ h)
Growth medium	Simple Cheap	Simple Cheap	Complex Expensive	Complex Expensive
Expression level	High	Low – High	Low – High	Low – Moderate
Secretion	Periplasm	Medium	Medium	Medium
Post-translational modifications				
N-linked glycosylation	no	yes (high mannose)	yes (simple, no sialic acid)	yes (complex)
O-linked glycosylation	no	yes	yes	yes
Phosphorylation	no	yes	yes	yes
Acylation	no	yes	yes	yes
Acetylation	no	yes	yes	yes
g-carboxylation	no	no	no	yes

Characteristics of commonly used host organisms for protein production.

Systemy ekspresji

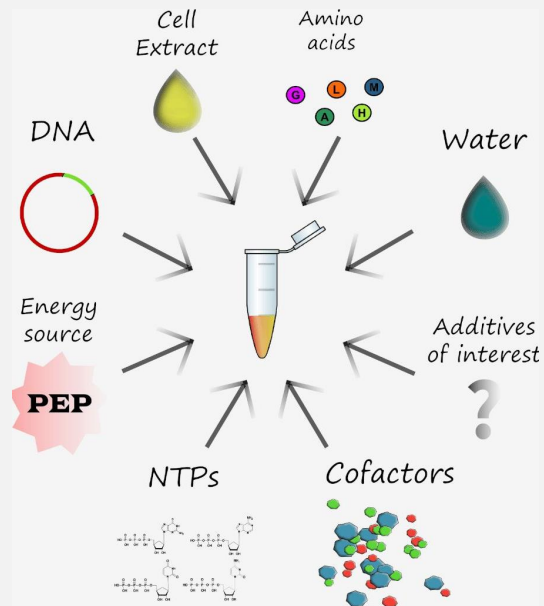
	WORST	BEST
SPEED	Transgenics, Plants, Mammalian, Insect, Yeast	Bacteria
COST	Transgenics, Mammalian, Plants, Insect, Yeast	Bacteria
GLYCO-SYLATION	Bacteria, Yeast, Plants, Insect	Transgenics, Mammalian
FOLDING	Bacteria, Yeast	Plants, Insect, Transgenics, Mammalian
FOLDING	Bacteria, Yeast	Plants, Insect, Transgenics, Mammalian

Pozakomórkowe systemy ekspresji białek



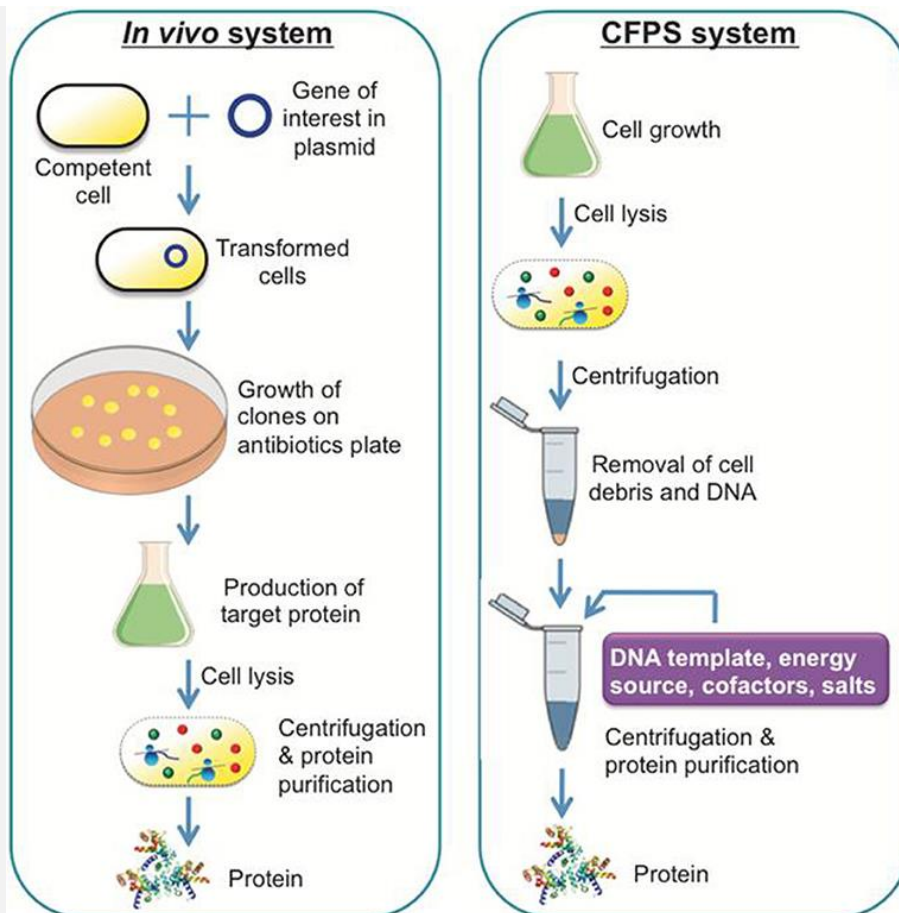
CFPS

- Cell-free protein synthesis (CFPS) system
- Prosty
- Szybki
- Wrażliwy
- Pozbawiony błon komórkowych
- ...system pozakomórkowej syntezy białek.



111

112

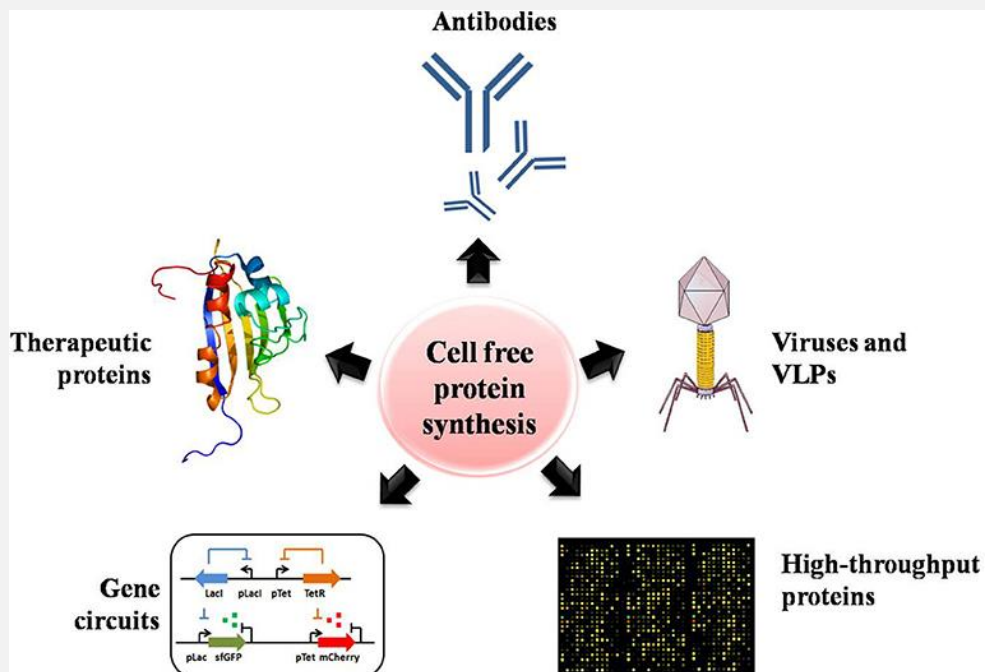


Zastosowanie

- ▶ Toksyczne i biologicznie niebezpieczne białka.
 - ▶ Białka błonowe.
 - ▶ Enzymy szkodliwe dla nosiciela
 - ▶ Białka terapeutyczne
-
- ▶ Wprowadzanie nienaturalnych aminokwasów

<p>Functional Genome/ Proteome Analysis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gene mutation/deletion analysis (e.g., enzyme kinetics) • Protein domain mapping • Characterization of protein interactions • Gel Shift EMSA • Generation of protein arrays <p>Expression of Difficult-to-Express Proteins</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cell-toxic proteins, membrane protein, viral proteins, kinases <p>Protein Evolution/ Enzyme Engineering</p> <ul style="list-style-type: none"> • Display technologies (e.g., ribosome, mRNA display, in vitro compartmentalization) • Evolution of antibodies in vitro by ribosome display 	<p>Analysis of Transcriptional/ Translational Regulation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Structural RNA analysis such as characterization of regulatory elements for translation (e.g., UTRs, Capping, IRES) • RNA virus characterization <p>Screenings</p> <ul style="list-style-type: none"> • Screening of chemical libraries for effect on translation • Drug screening (e.g., antibiotics) <p>Protein Labeling</p> <ul style="list-style-type: none"> • Open systems allow the incorporation of labeled amino acids
--	---

113



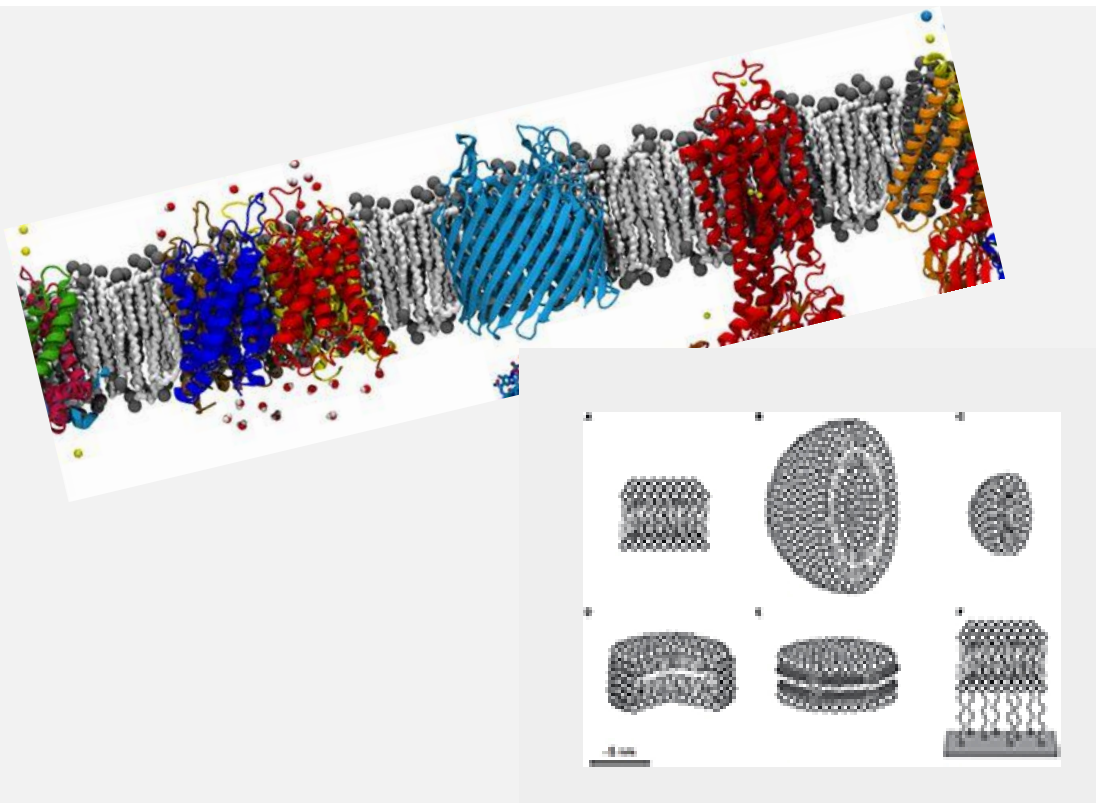
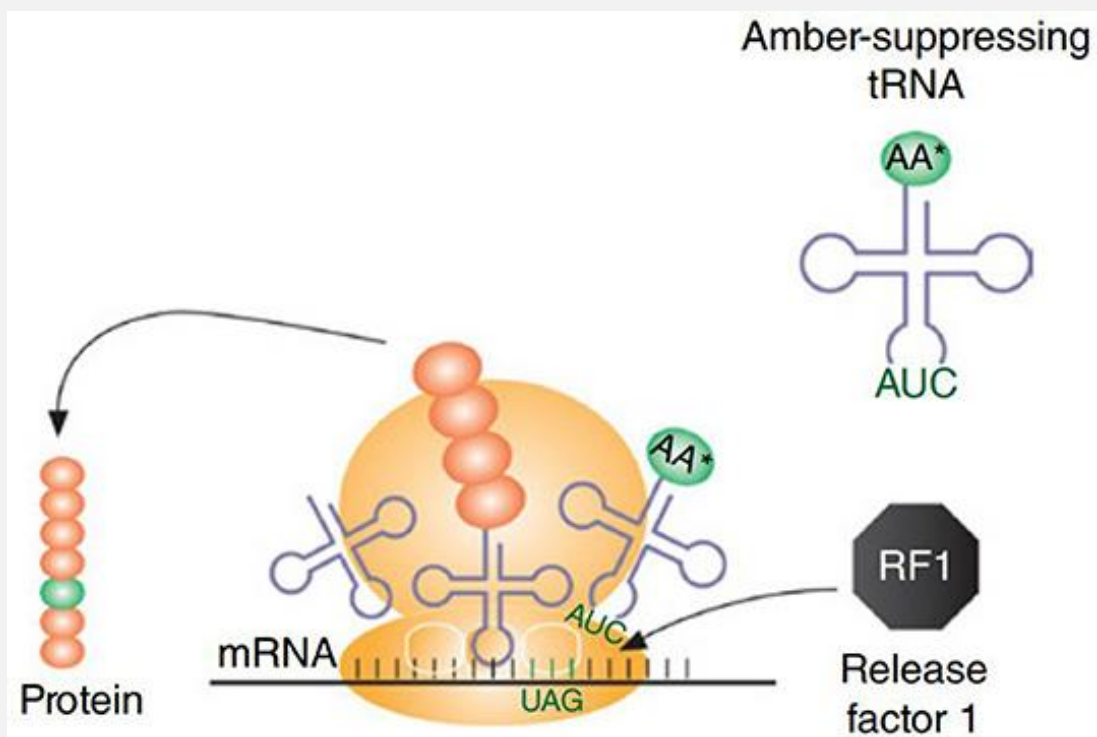
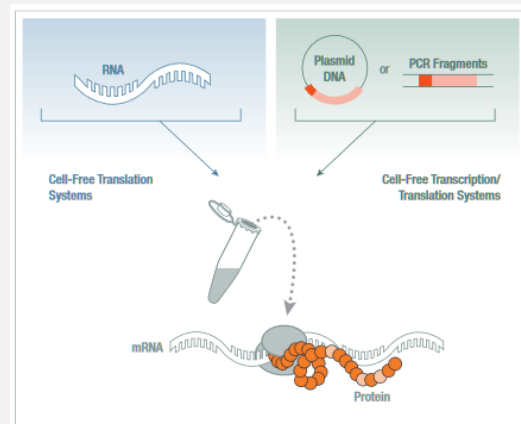


Figure 5. To produce membrane proteins through CFPS platforms, several membrane-mimicking structures are used. (A) Lipid bilayer, (B) liposome, (C) micelle, (D) bicelle, (E) nanodisc, and (F) tethered bilayer lipid membrane. Figure reproduced with permission from (Schoborg and Jewett, 2018) © John Wiley and Sons, Inc.



Komponenty sytemu

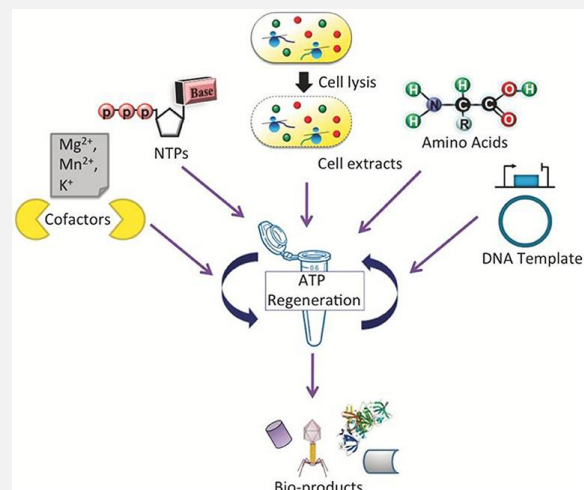
- Niezbędne elementy:
 - Rybosomy
 - tRNA
 - Aminoacylo-tRNA syntetazy
 - Czynniki inicjacji, elongacji, terminacji
- Aminokwasy
- Źródła energii (ATP, GTP)
- Systemy regeneracji energii
- Sole i inne składniki, np. bufor



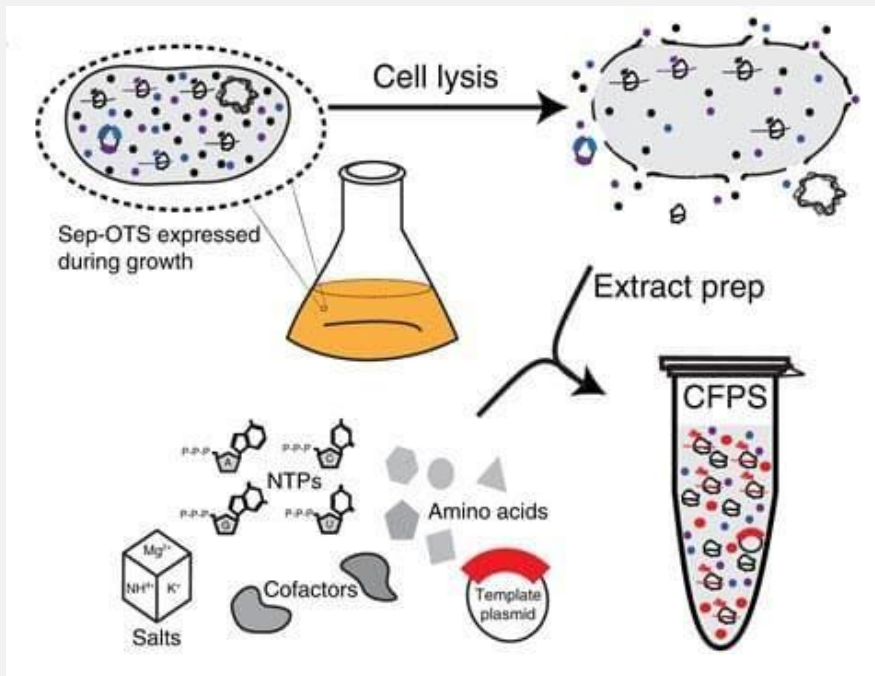
117

Pochodzenie komponentów

- *E. coli* Lysate
- Wheat Germ
- CHO Cell Lysate
- Rabbit Reticulocyte Lysate
- Insect Cell Lysate
- HEK Cell Lysate



118



INSULINA

LEK CORAZ BARDZIEJ
DOSKONAŁY



Insulina \neq Insulina
dziś 100 lat temu

POCZĄTKI LECZENIA INSULINĄ:

- X Insulina pozyskiwana była z trzustek zwierząt 
- X Lek był słabo oczyszczony 
- X Często pojawiały się powikłania skórne 
- X Lek był niewystandaryzowany (nie zawsze działał z taką samą siłą) 
- X Zastrzyki były bolesne 
- X Nie dysponowano insuliną bazalną i doposiłkową, był jeden lek, który obniżał poziom cukru we krwi. 

INSULINOTERAPIA DZISIAJ:

- ✓ Insulina pozyskiwana jest metodami inżynierii genetycznej 
- ✓ Dysponujemy insulinami o różnym czasie i początku działania
- ✓ Insuliny bez szczytu działania minimalizują ryzyko hipoglikemii
- ✓ Insuliny analogowe zmniejszają ryzyko przyrostu masy ciała
- ✓ Lek podawany jest w wygodny, praktycznie bezbolesny sposób
- ✓ Powikłania skórne przy rotacji miejsc iniekcji nie występują

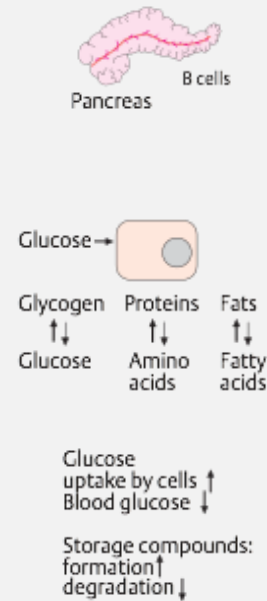

 POLSKIE STOWARZYSZENIE DIABETYKÓW &
 
 TZf
 

IB w praktyce

Insulina

Cukrzyca

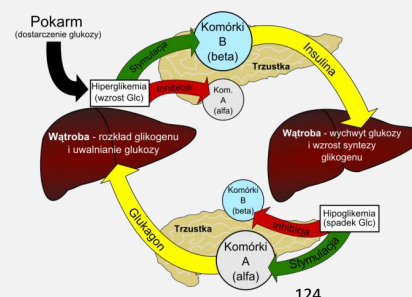
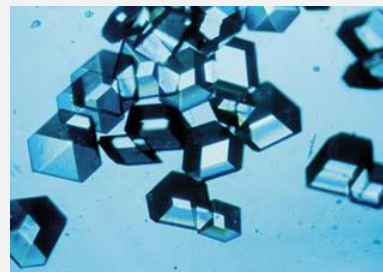
- Grupa chorób metabolicznych charakteryzująca się hiperglikemią (podwyższonym poziomem glukozy we krwi) wynikającą z defektu produkcji lub działania insuliny wydzielanej przez komórki beta trzustki. Przewlekła hiperglikemia wiąże się z uszkodzeniem, zaburzeniem czynności i niewydolnością różnych narządów, szczególnie oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych. Ze względu na przyczynę i przebieg choroby, można wyróżnić cukrzycę typu 1, typu 2, cukrzycę ciężarnych i inne [Wikipedia].



123

Insulina

- (łac. *insula*, czyli wyspa, od wysepek Langerhansa, które ją wytwarzają)
- Anaboliczny hormon peptydowy o działaniu ogólnoustrojowym odgrywający zasadniczą rolę w metabolizmie węglowodanów (także białek i tłuszczów) [Wikipedia].



124

Terapia insulinowa

- Czy muszę zacząć brać insulinę, ponieważ nie poradziłem/am sobie z leczeniem cukrzycy?
- Czy wstrzyknięcia boją?
- Czy stosowanie insuliny oznacza, że moja choroba postępuje?
- Czy przybiorę na wadze?
- Jak mam się nauczyć wstrzykiwania sobie insuliny?
- Czy będę mieć zbyt niskie stężenie glukozy we krwi (hipoglikemię)?
- Czy trzeba będzie zmienić pracę lub zrezygnować ze swoich zainteresowań?
- Czy stosowanie insuliny jest skomplikowane?

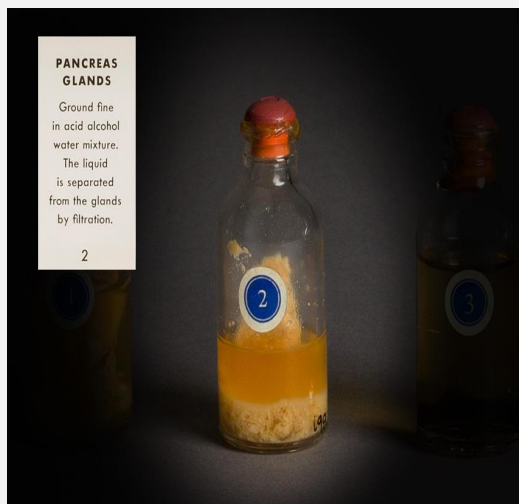
Produkcja

- 1922 odkrycie
- 1923 Eli Lilly, USA wprowadza pierwszą insulinę do obrotu
- 1923 Nordisk Insulinlaboratorium, Dania rozpoczyna produkcję insuliny z trzustki wołowej
- Za datę rozpoczęcia produkcji w Polsce przyjęto rok 1924, gdy w Państwowym Zakładzie Higieny uzyskano pierwsze 315 000 jednostek insuliny. Uruchomienie produkcji w oparciu o technologię opracowaną w Kanadzie odbyło się w latach 1928-1929. Polska była czwartym krajem w Europie (po Anglii, Danii i Niemczech), który uruchomił produkcję insuliny.
- Po II wojnie światowej produkcja insuliny była kontynuowana przez Zjednoczenie Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed” w Warszawie.
- 1953 produkcja w zakładach Polfy Tarchomin

Insulin sales kit, Eli Lilly and Company, 1940s



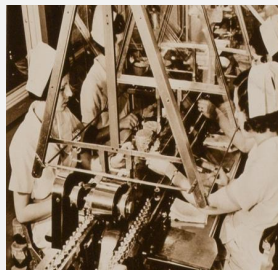
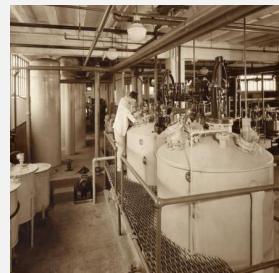
2024







2024



Bioton, Macierzysze pod Warszawą



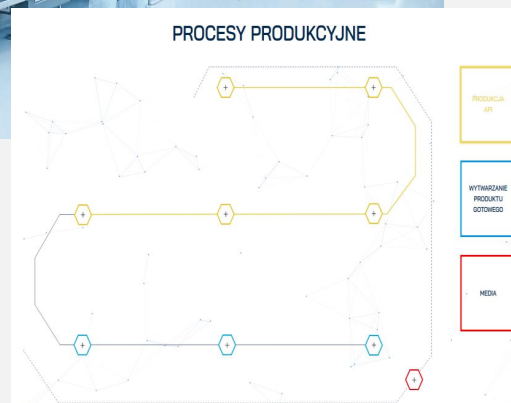
2024

Bioton

Fabryka BIOTON w Macierzyszu pod Warszawą to jeden z najnowocześniejszych zakładów biotechnologicznych na świecie. To w niej powstaje insulina – zarówno substancja czynna, jak i gotowe formy leku. BIOTON produkuje insulinę najwyższej jakości na skalę komercyjną, zapewniając pacjentom bezpieczne i skuteczne leczenie cukrzycy.

Posiadamy dwa zakłady produkcyjne: Zakład Produkcyjny Nr 1 zajmujący się produkcją form gotowych oraz Zakład Biotechnologii – wytwarzający substancję czynną (API).

[Materiały prasowe]



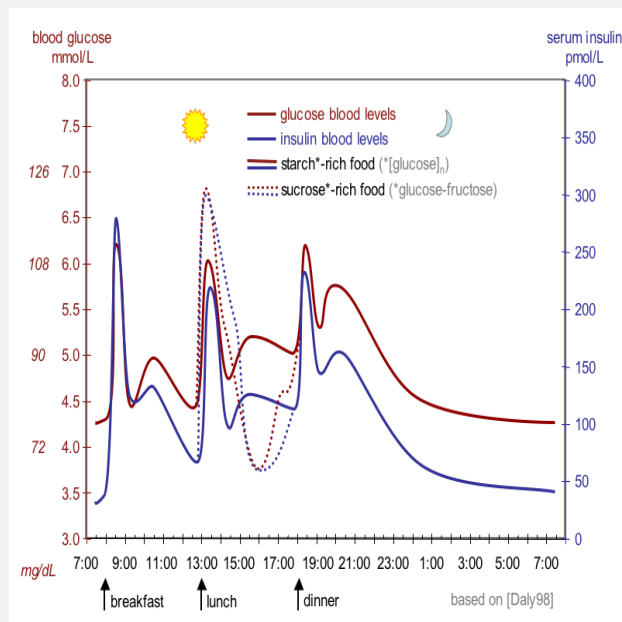
Rodzaje insuliny

- U zdrowego człowieka trzustka produkuje w różnym czasie różne ilości insuliny. W okresie między posiłkami i w nocy insulina jest wytwarzana w mniejszych, mniej więcej stałych ilościach (**insulina bazowa**). Po posiłkach wytwarzane są większe ilości insuliny (**insulina okołoposiłkowa**). Takie wydzielanie insuliny zapewnia prawidłową kontrolę glikemii przez całą dobę.
- W związku z tym, że u osób z cukrzycą organizm nie produkuje własnej insuliny lub produkuje jej za mało, może być konieczne stosowanie więcej niż jednego preparatu insuliny, aby uzyskać efekt podobny do sytuacji u zdrowego człowieka. Różne rodzaje insuliny mają różny profil działania.

Insulina rekombinowana

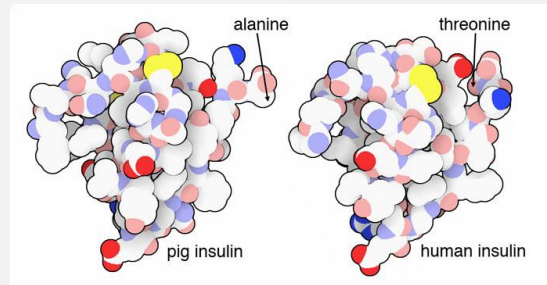
Analogi ludzkiej insuliny otrzymuje się na drodze modyfikacji genetycznej. Rekombinowane są komórki drożdży lub *Escherichii coli*.

Od ludzkiej insuliny analogi różnią się strukturą chemiczną związku, która wpływa na właściwości farmakologiczne, przyspieszając lub zwalniając wchłanianie hormonu z tkanki podskórnej.



Historia insuliny farmaceutycznej

- 1922
odkrycie
- 1923 Eli Lilly, USA
wprowadza pierwszą insulinę
do obrotu
- 1923 Nordisk
Insulinlaboratorium, Dania
rozpoczyna produkcję
insuliny z trzustki wołowej



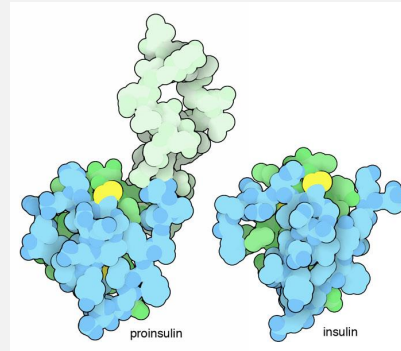
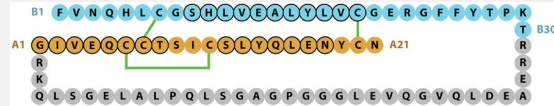
137

Charakterystyka fizykochemiczna

- 1926-1953
 - krystalizacja [Abel, 1926]
 - określenie masy molowej [Sjögren and Svedberg, 1931]
 - potwierdzenie istnienia wiązań dwusiarczkowych [Sanger, 1949]
 - wyznaczenie struktury [Crowfoot, 1935]

Struktura pierwszorzędowa

- ↳ Łańcuchy polipeptydowe:
 - ↳ A 21 AA
 - ↳ B 30 AA
- ↳ Wiązania dwusiarczkowe:
 - ↳ CysB7-CysA7
 - ↳ CysB19-CysA20
 - ↳ CysA6-CysA11
- ↳ Sanger and Tuppy, 1951
- ↳ Sanger and Thompson, 1953



139

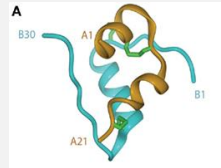
Synteza

- ↳ 1960
 - ↳ w ramach eksperymentu z tkanką rakową zdolną do produkcji insuliny wykazano istnienie 2 komponentów cięższego (9-10kDa) i lżejszego
- ↳ 20 lat później...
 - ↳ potwierdzono istnienie białek należących do subtilizym zdolnych do proteolitycznego cięcia proinsuliny
- ↳ Steiner and Oyer, 1967;
- ↳ Steiner et al., 1967
- ↳ Smeekens and Steiner, 1990;
- ↳ Smeekens et al., 1991

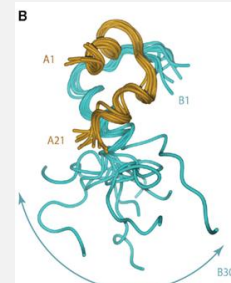
Struktura

► 1969 Dorothy Hodgkin

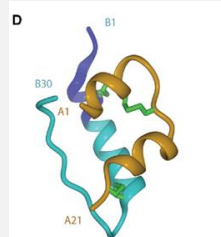
- 'The B-chain consists of an N-terminal segment (residues B1–B6), a type II β -turn (B7–B10) a central α -helix (B9–B19), a type I β -turn (B20–B23), and a C-terminal β -strand (B24–B28), followed by residues B29 and B30, which are less well ordered (Figure 2A). The A-chain consists of an N-terminal α -helix (A1–A8), a non-canonical turn (A9–A11), a second α -helix (A12–A18), and a C-terminal segment (A19–A21).'



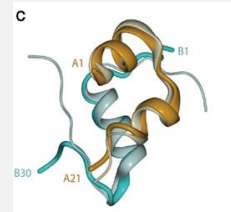
(A) Tertiary structure of the porcine insulin monomer in its 2 Zn rhombohedral form (PDB entry 4INS).



(B) Structure of the human insulin mutant Gly624 (PDB entry 1HIT), showing the flexibility of the B-chain C-terminus.



(C) Structure of a high affinity N-MetA236 human insulin mutant (PDB entry 2N0X, solid color) overlaid on that of wild-type hormone (gray).



(D) Structure of the so-called R state form of porcine insulin (PDB entry 1ZNI), with the N-terminal extension of the B-chain helix shown in blue.

141

Inżynieria insuliny

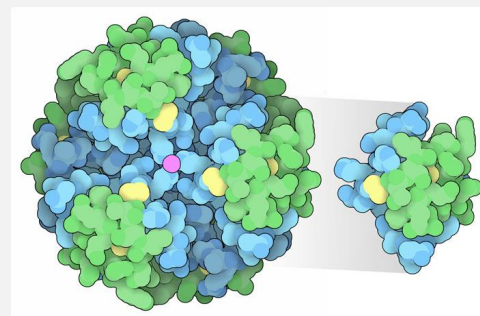
► Cele:

► źródło

- białko rekombinowane *vs.* naturalne

► czas działania

- uwalnianie produktu
- wydłużenie działania

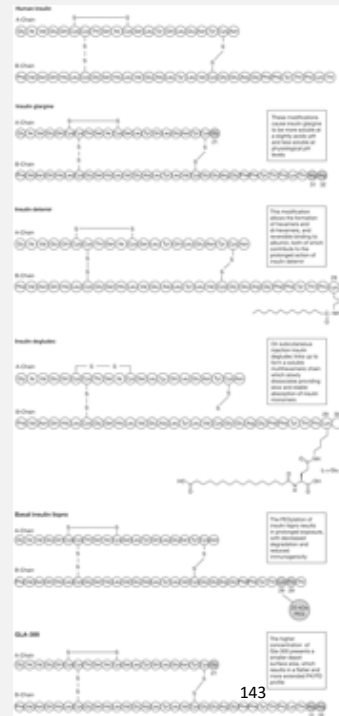


PDB ID: 1TRZ

142

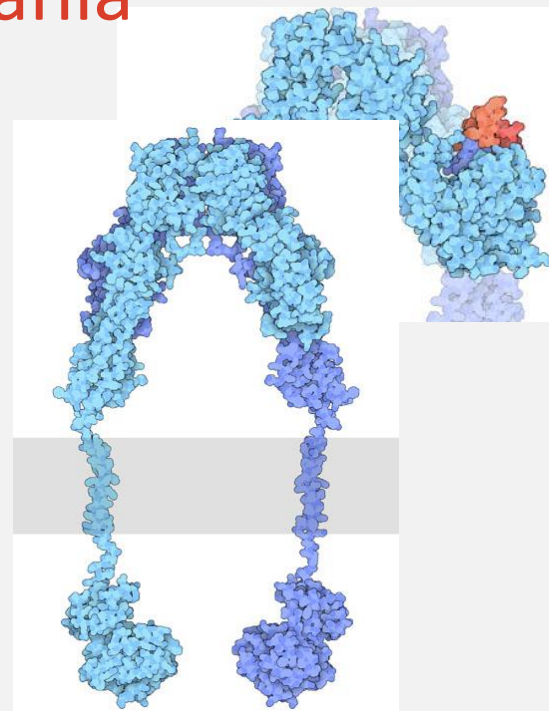
Uwalnianie produktu

- fuzja z białkami zmniejszającymi rozpuszczalność (protamina)
- wprowadzenie mutacji:
 - 2xArg, Asp-Gly
 - Glargine (Lantus™)



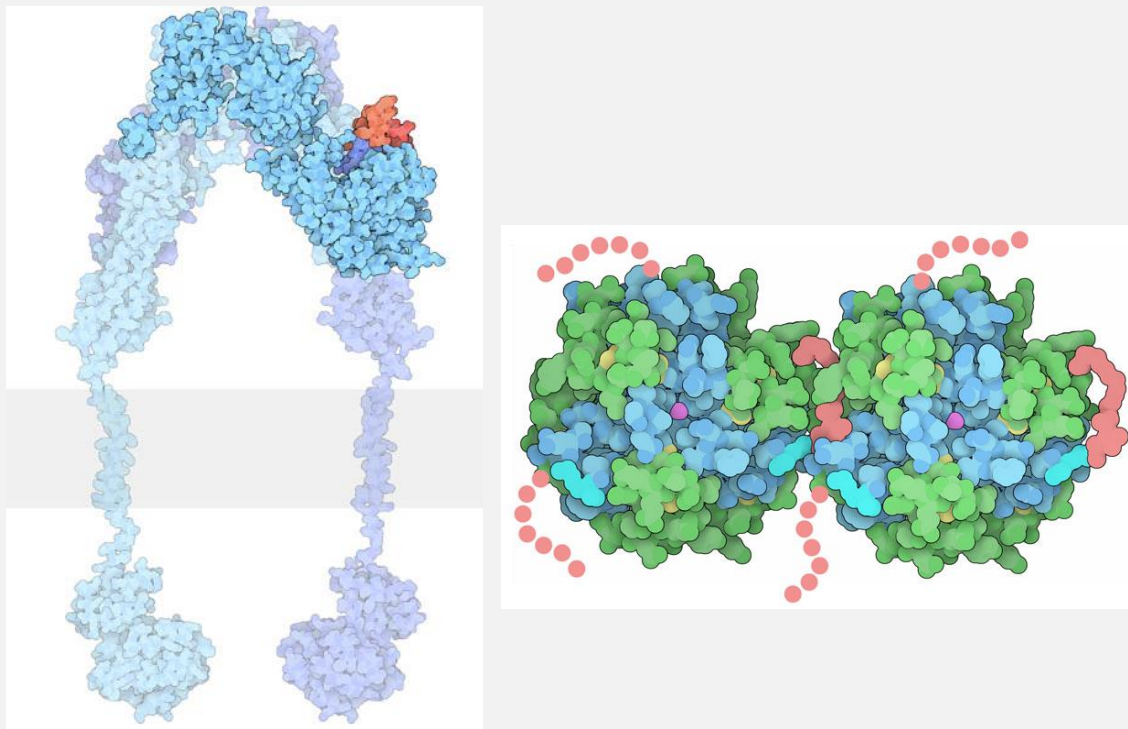
Wydłużenie działania

- Insulin *vs.* glukagon
 - spadek stężenia glukozy we krwi powoduje uwolnienie glukagonu z trzustki i stymulację wątroby do 'produkcji' glukozy
 - wzrost stężenie glukozy we krwi powoduje uwolnienie przez trzustkę insuliny, która stymuluje wchłanianie glukozy przez komórki
- Receptor
 - dimer połączony w dwoma cząsteczkami kinaz



PDB ID:3LOH

144



Insulina rekombinowana

- *E. coli*
 - Brak modyfikacji potranslacyjnych (PTM), np.: glikozylacji, fosforylacji, kompatybilnej proteolizy, formowania mostków dwusiarczkowych.
 - Niski poziom ekspresji ze względu na inne wykorzystanie kodonów DNA.
 - Degradacja białek rekombinowanych przez natywne proteazy.
 - Akumulacja w ciałach inkluzyjnych.

Insulina rekombinowana

- *Drożdżowe systemy ekspresji*
np.: Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris
 - Kompatybilne PTM.
 - Ekspresja w formie rozpuszczalnej.

2024

Source	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>
Destination of product	Cytoplasm	Secreted	Secreted	Secreted
Biomass cell dry weight (g/l)	80, in bioreactor with fed-batch culture	1.2, in shake flask with batch culture	5, in shake flask with batch culture	59, in bioreactor with fed-batch culture
Typical spec. growth rate (1/h)	0.08- 0.12	not specified	< 0.33	<0.03
Typical spec. production rate (mg/gh)	14.2	3.4	0.21	0.375
Product concentration (g/L)	4.34	0.009	0.075	3.075
Productivity (mg/l h)	1,085	4.01	1.04	17
Reference	[21]	[22]	[19]	[23]

- Front. Endocrinol., 22 November 2011
DOI:10.3389/fendo.2011.00076
- Diabetes/Metabolism Research and Reviews
DOI: 10.1002/dmrr.2763
- Molecule of the month
DOI:10.2210/rcsb_pdb/mom_2016_2
DOI:10.2210/rcsb_pdb/mom_2015_2

IB w praktyce

Katalizatory enzymatyczne

Kataliza przemysłowa

▸ Rodzaje katalizy:

- homogeniczną – kiedy katalizator znajduje się w tej samej fazie termodynamicznej co substraty (np. jest razem z substratami rozpuszczony w układzie)
- heterogeniczną – kiedy katalizator znajduje się w innej fazie termodynamicznej niż jeden lub wszystkie substraty (np. katalizator jest osadzony na powierzchni ciała stałego)



151

Katalizator

▸ Wsparcie:

- umiejscowienie miejsc aktywnych na nośniku pozwalającym zmaksymalizować jego powierzchnię aktywną

▸ Odporność:

- minimalizacją wpływu substancji deaktywujących katalizator/inhibitorów

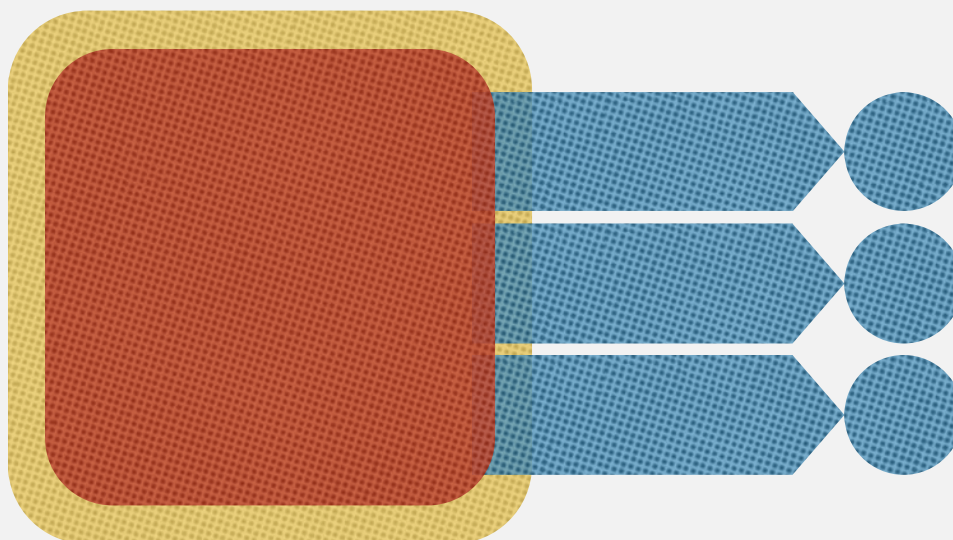
▸ Regeneracja:

- odnowa katalizatora pomiędzy cyklami produkcyjnymi

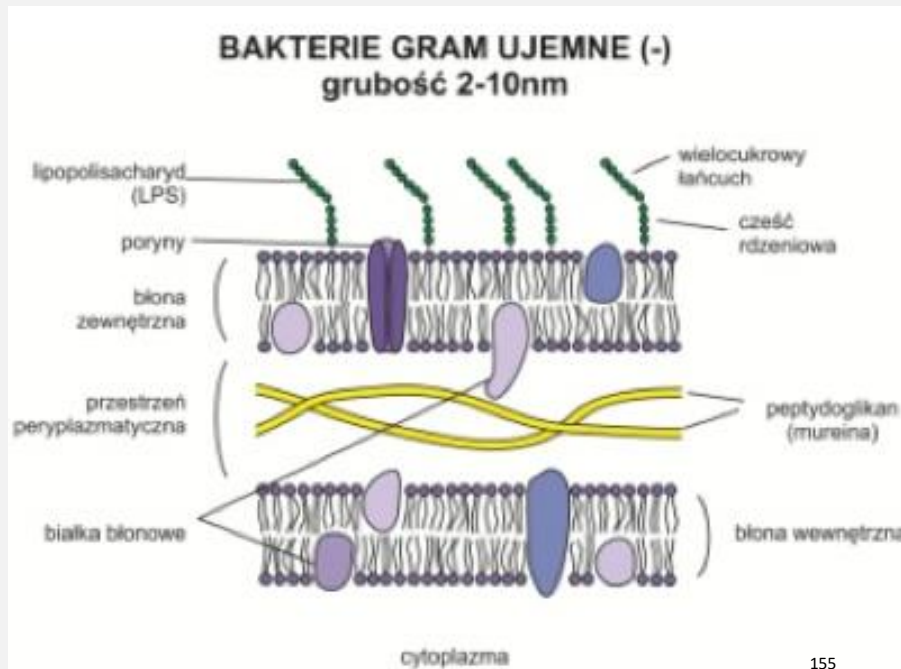
Katalizator enzymatyczny

- Wsparcie:
 - na szkielecie komórek wytwarzających białko
- Odporność:
 - stabilizacja poprzez czeperony
- Regeneracja:
 - ciągła ekspresja katalizatora

Katalizator enzymatyczny



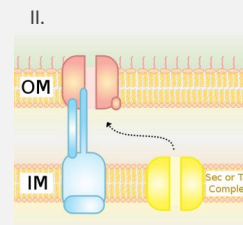
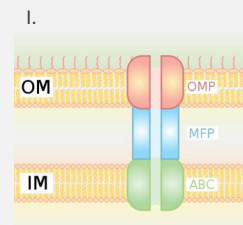
Sekrecja u bakterii gram-ujemnych



Typy sekrecji

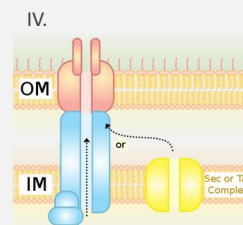
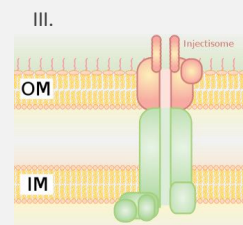
Typ I

- Sekrecja Sec-niezależna. To transport białka przez IM i OM z pominięciem periplazmy. Białka biorące w nim udział to:
 - wewnątrz błonowy exporter ABC,
 - białko MFP (ang. Membrane Fusion Protein),
 - białko OMP (ang. Outer Membrane Protein).
 Tworzy one kanał, przez który zostaje wydzielone białko, zakończeniu sekrecji struktura kanału rozpada się.



Typ II

- Sekrecja Sec-zależna. To dwuetapowy proces, najpierw następuje transport białek przez IM za pomocą systemu Sec, następnie następuje przejście białka po przez OM przez sekreton-kompleks zakotwiczony w obu błonach, utworzony z 12-15 białek. To typ sekrecji białek w pełni złożonych.



Typ III

- Sekrecja Sec-niezależna. Ten typ sekrecji wykorzystywany jest przez bakterie patogeniczne w celu wprowadzenia czynników wirulencji do komórek gospodarza. Białka muszą być przetransportowane przez 3 błony (2 bakteryjne i zewnętrzną komórki zainfekowanej) z pominięciem periplazmy. Białka przechodzą przez kanał utworzony z białek o budowie pierścieniowej łączący IM i OM oraz przez białkową igłę do cytoplazmy komórki gospodarza.

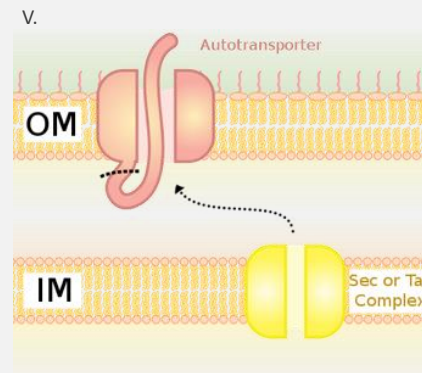
Typ IV

- Sekrecja Sec-zależna. Ten typ służy do wydzielania białek (dwuetapowo) oraz translokacji cząsteczek DNA (jednotapowo) do komórek gospodarza. Przeniesienie białek do komórki zainfekowanej umożliwia białkowa struktura-pila.

Typ V - autotransportery

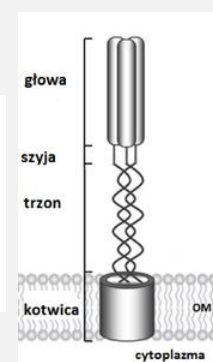
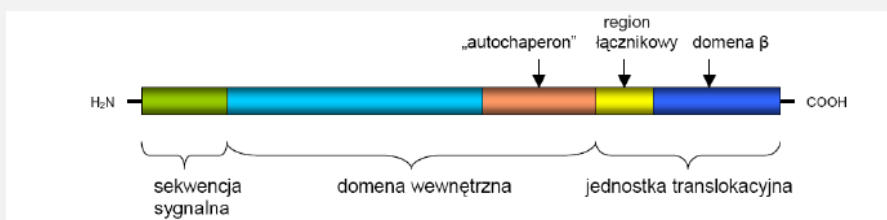
Typ V

- Autotransportery to białka, które nie potrzebują do sekrecji białek z periplazmy dodatkowego aparatu.
- Autotransporter składa się z:
 - N-terminalnej sekwencji białkowej,
 - domeny C-terminalnej,
 - wewnętrznej domeny funkcjonalnej.
- Mechanizm autotransportu nie wymaga dostarczenia energii z zewnątrz.

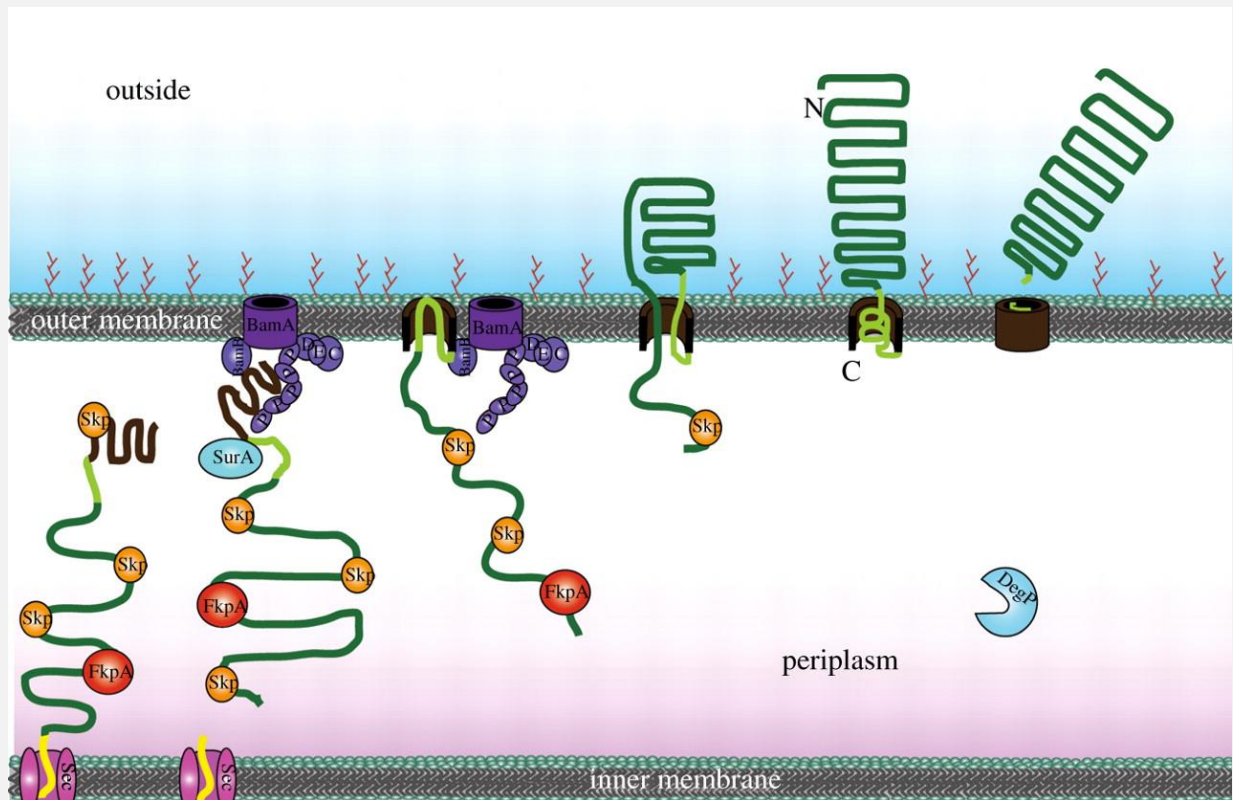
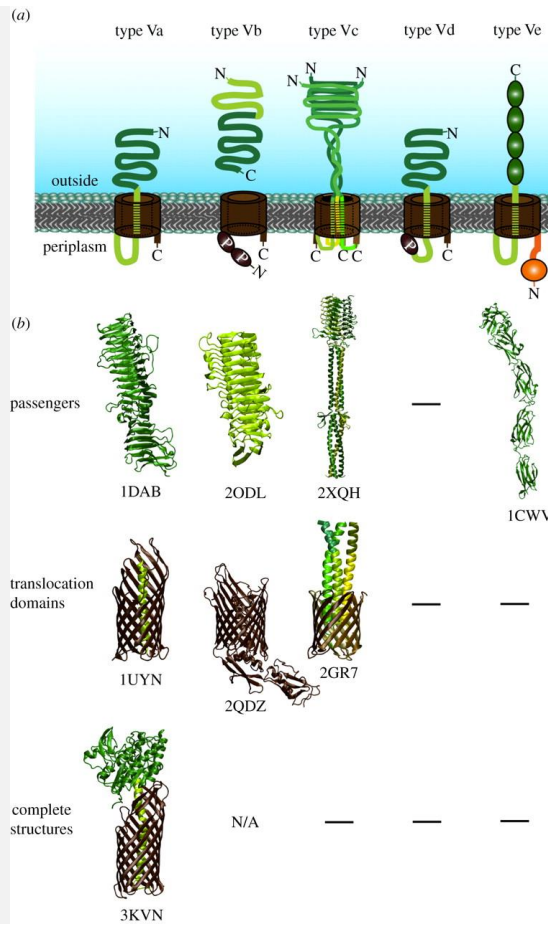


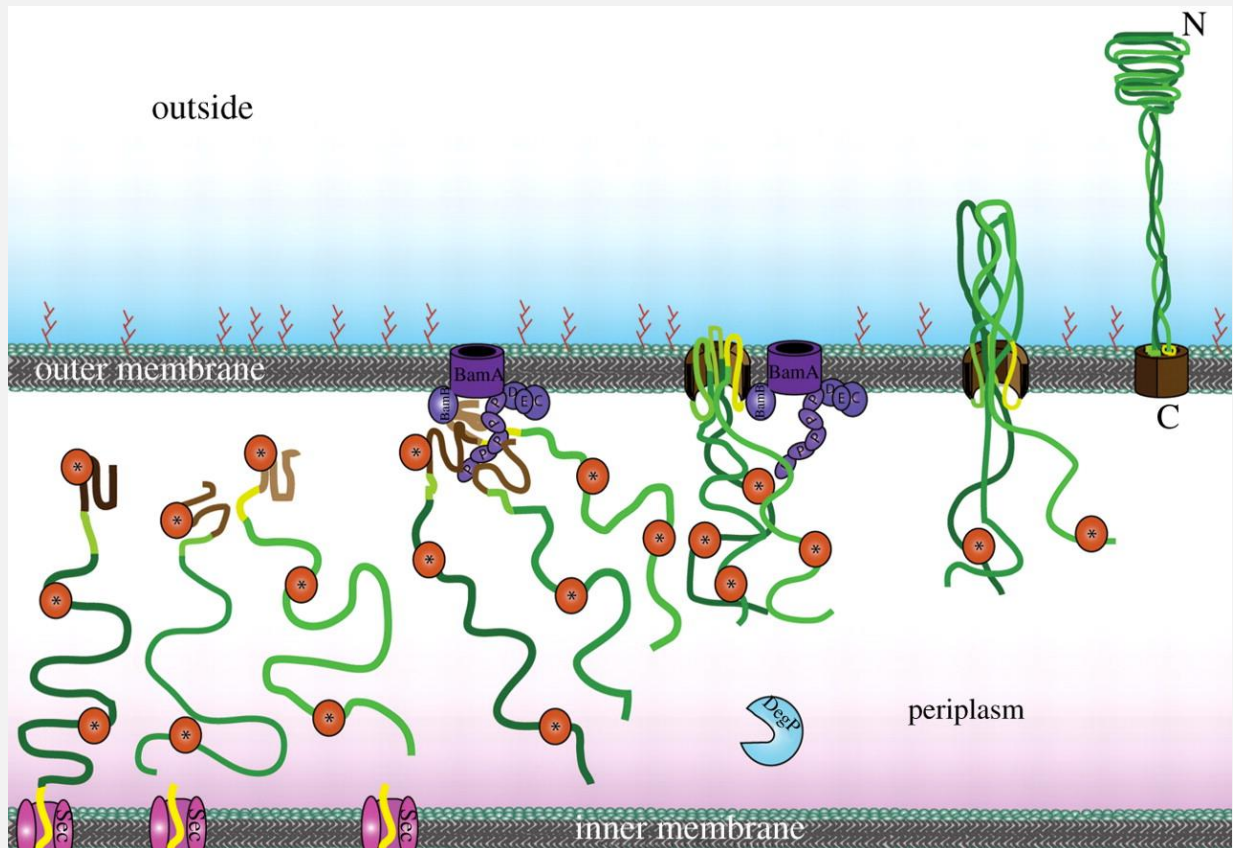
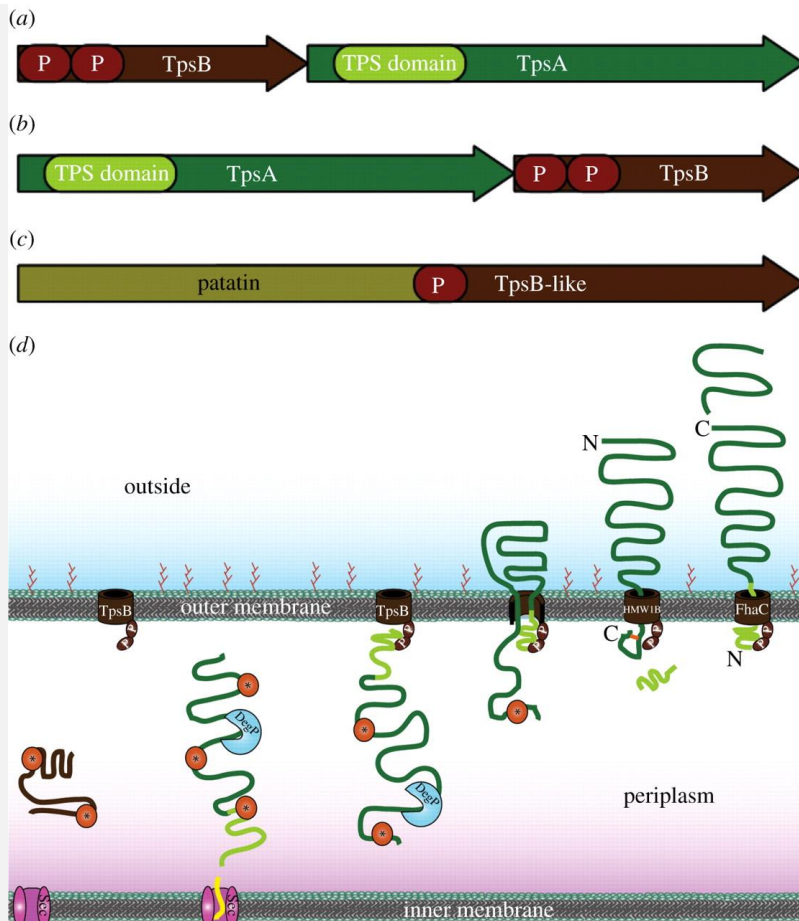
157

Typ V - autotransportery



158





YadA

prototypowy TAA (Trimeric Autotransporter Adhesin)

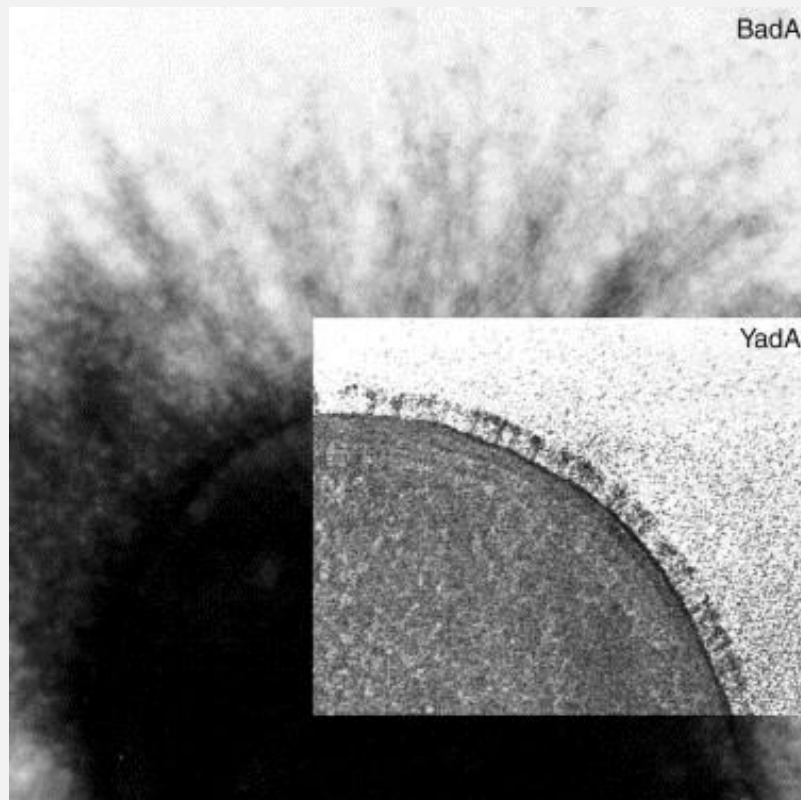
↳ Pochodzenie:

- bakterie z rodzaju *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*).
- Czarna śmierć – termin określający jedną z największych epidemii w dziejach ludzkości, panującą w XIV-wiecznej Europie. Obecnie za jej przyczynę uważa się bakterię *Yersinia pestis* (zwaną też pałeczką dżumy), powodującą dżumę, na co wskazuje analiza DNA ofiar zarazy. Epidemia czarnej śmierci wybuchła w Azji Środkowej, być może Chinach, skąd przez jedwabny szlak w 1346 dostała się na Krym, skąd prawdopodobnie roznieśli ją pasożytujące na zamieszkujących ówczesne statki handlowe szczurach śniadych pchły. Szacuje się, że szerząc się w Europie i okolicach Morza Śródziemnego, przyczyniła się do śmierci (w zależności od szacunków) 30–60% ówczesnej populacji Europy, ogólnie zaś przyczyniła się do spadku ogólnoswiatowej liczebności ludzkiej styl do poprawy] z 450 milionów do 350–375 milionów w XIV wieku.



163

164



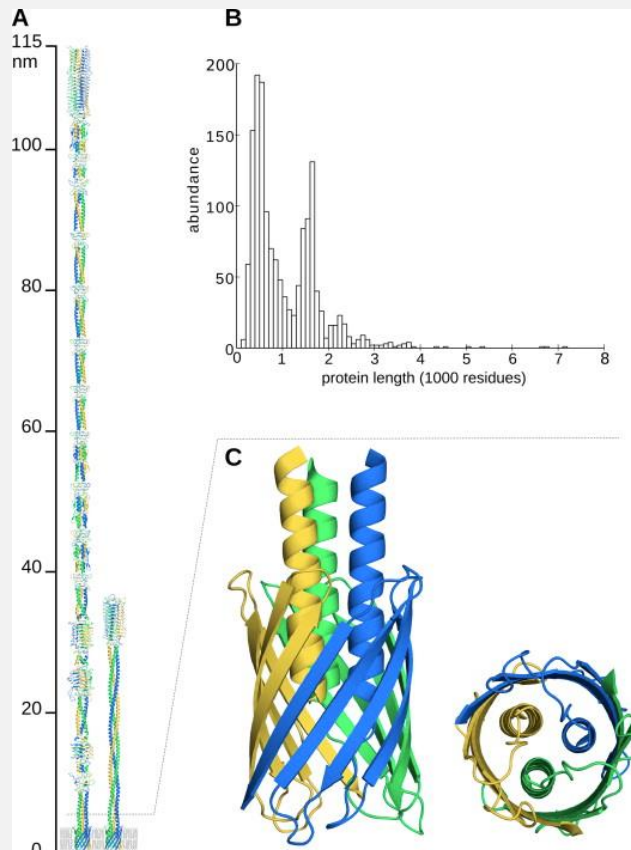
YadA

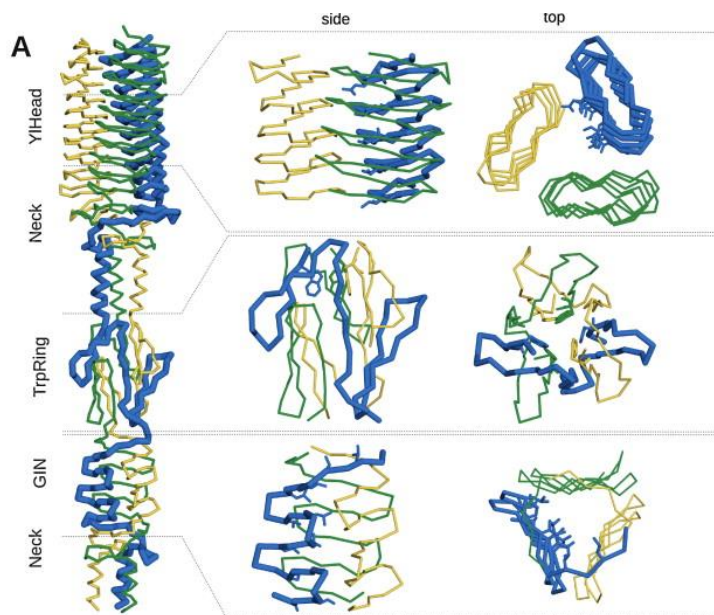
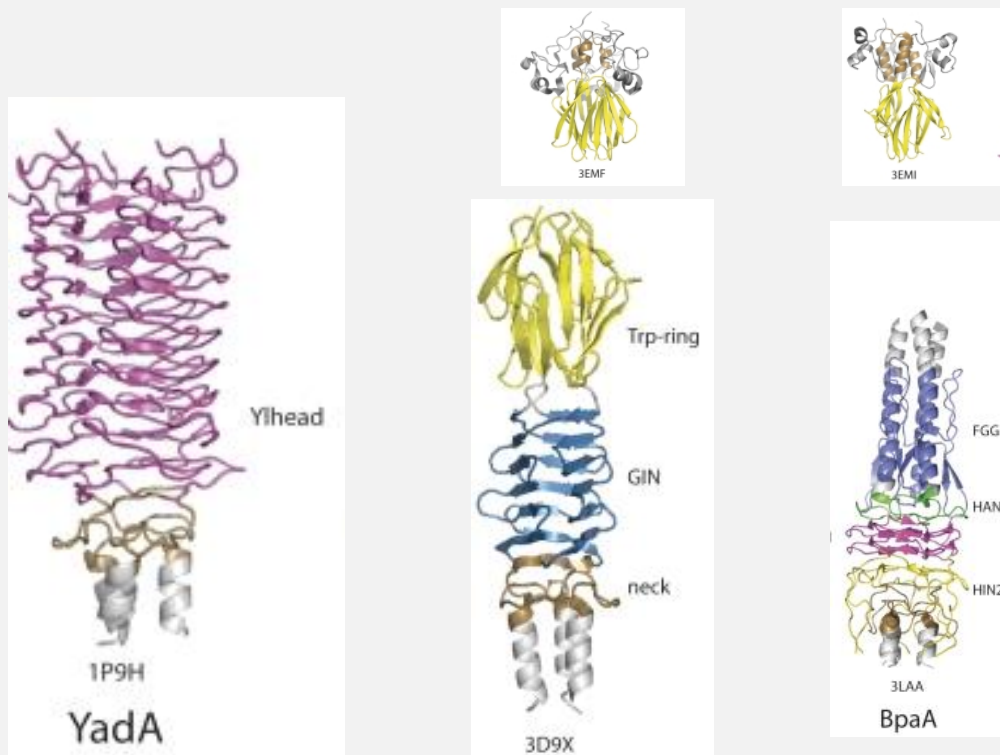
- Należy do białek adhezyjnych.
- Za jego pomocą bakteria po przejściu przez błonę śluzową jelita przymocowuje się do powierzchni i infekuje organizm.
- Wiąże się z kolagenem, lamina i fibronektyną.



165

166



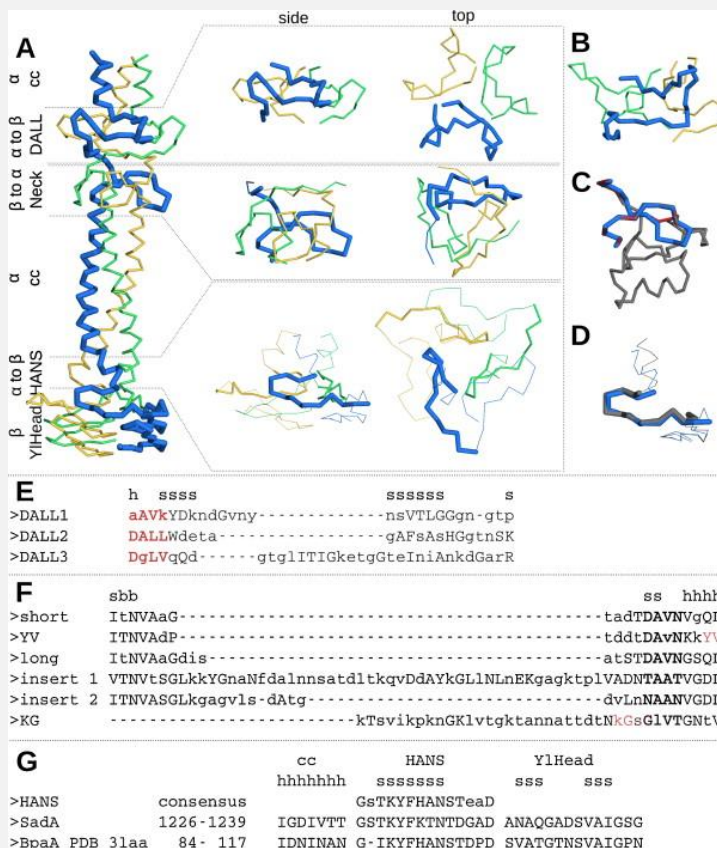


B

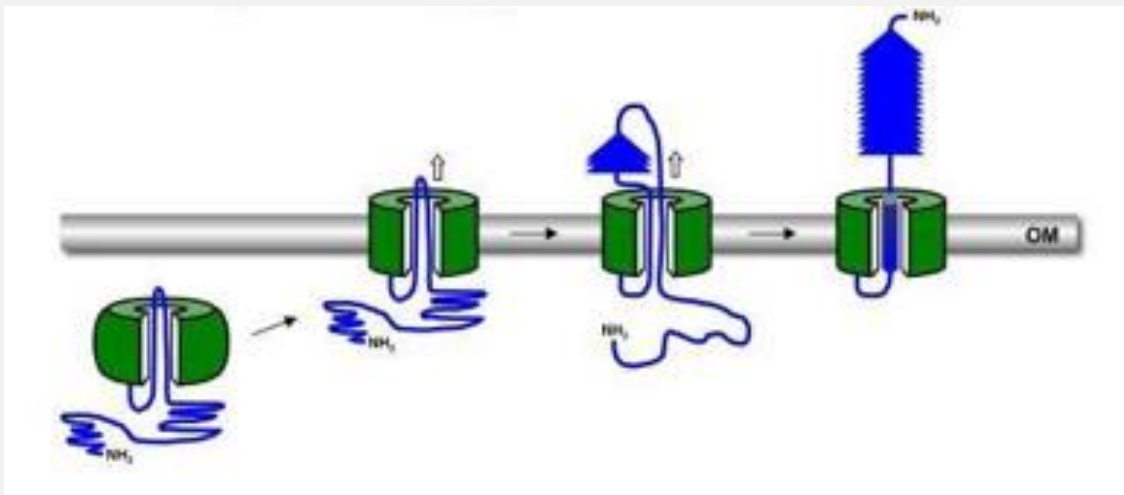
	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$
>TrpRing	GWVVSad	-gn eYsdqVK NA	NEVkFkG-	egG AtVsGKTd	dG vRtITVdV-
>FxG	GLkFaGn	dGt --vihkK LG	eTltIkGG	atd atklsd--	nN ---IqVvad
>GANG KTtVtaG-	kNi tVtstTna	DG sTiYtVaTa

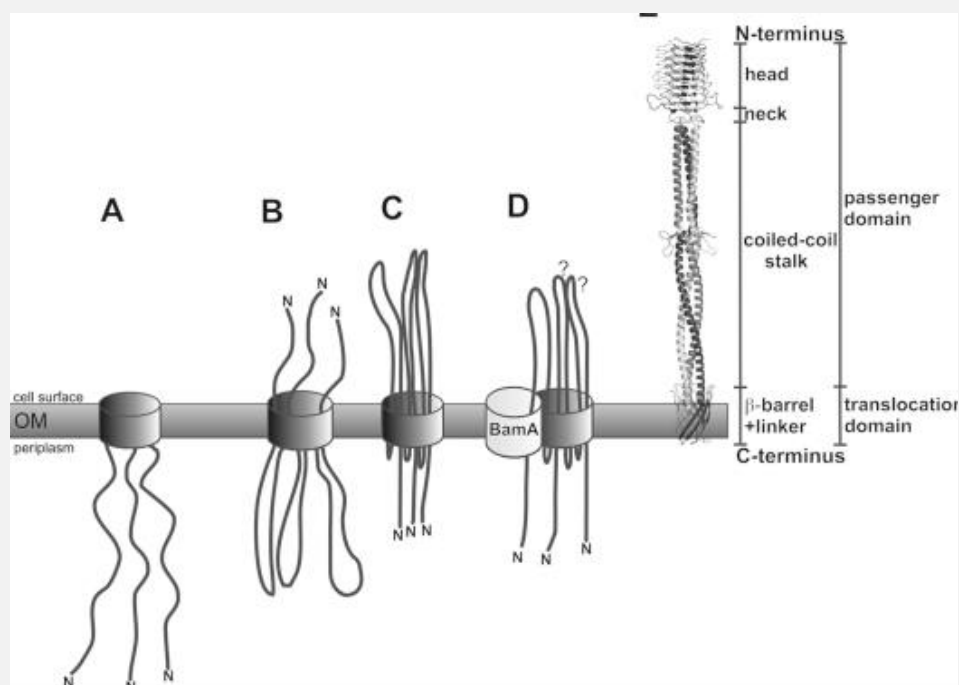
C

YlHead		GIN
outer	inner	
↖	akAsgdn svAiGnn	↑ -KD1t1-
↖	akAsgdn svAiGnn	↑ -dSVtGD
↖	akAsgdn svAiGnn	↑ -vvLNn-
↖	akAsgdn svAiGnn	↑ -tGLTIk n
↖	akAsgdn svAiGnn	↑ GPSITa-
↖	akAsgdn svAiGnn	↑ -sGINAG



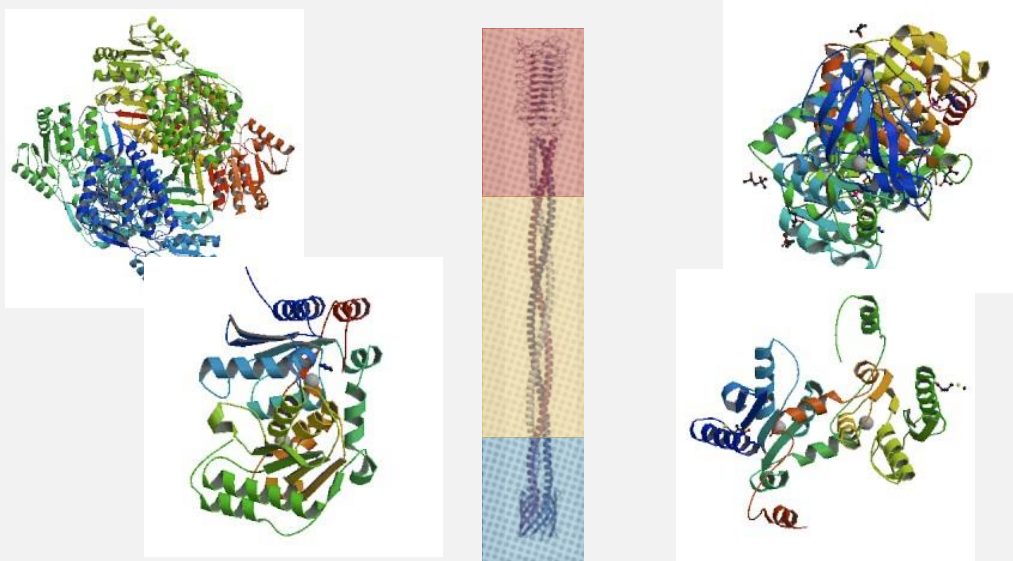
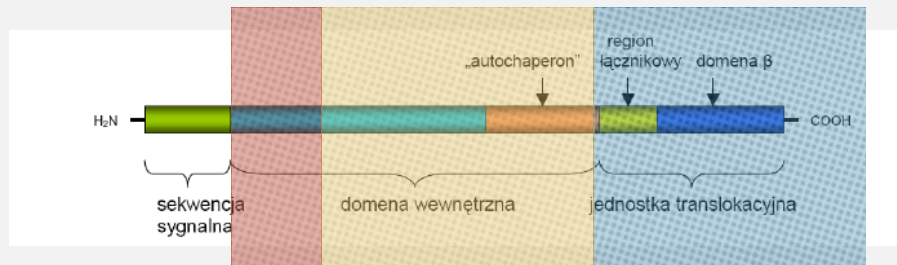
Typ V - autotransportery mechanism





Bacterial display

- Technika pozwalająca na umieszczenie na powierzchni bakterii bibliotek peptydów.
- W zamyśle technika pozwala na powiązanie funkcji białka z genem je kodującym.
- Wykorzystywana do:
 - identyfikację powinowactwa
 - mapowania epitopów przeciwciał
 - identyfikację substratów
 - dostarczania szczepionek

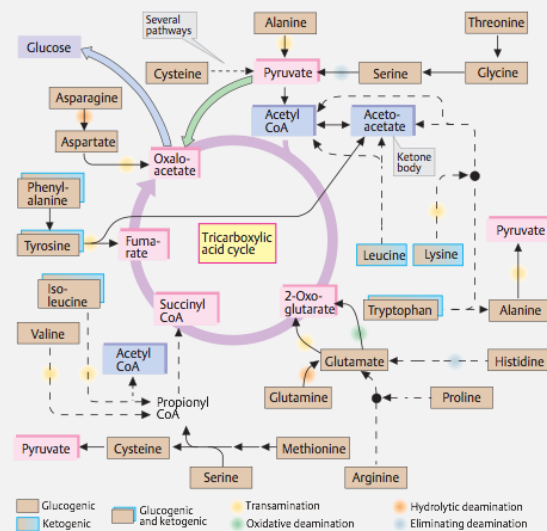


Problemy...

- TAA (trimeric autotransporters adhesins)
- Mechanizm transportu - synchronizacja
- Konfiguracja domeny katalizatora

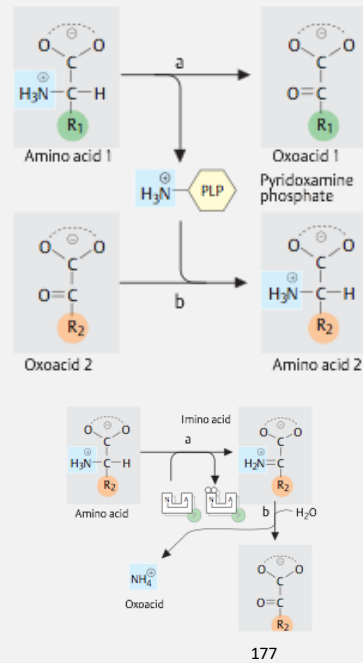
Deaminacja amino kwasów

- Metabolizm amino kwasów wymaga przede wszystkim możliwości manipulowania grupą NH_2 .



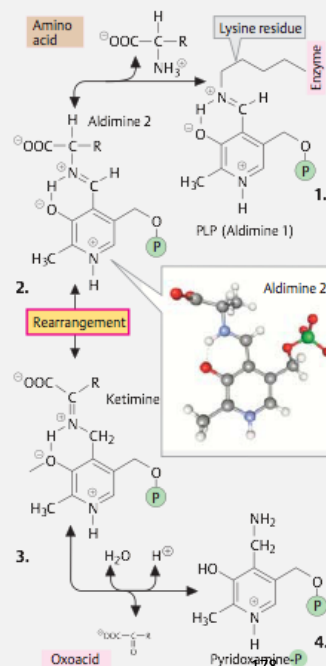
Deaminacja amino kwasów

- Transaminazy katalizują zarówno anaboliczne jak i kataboliczne przemiany w łańcuchu metabolicznym aminokwasów.
- Przemiany te mogą zachodzić na drodze:
 - transaminacji
 - deaminacji oksydacyjnej



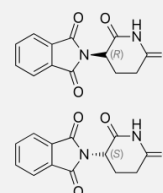
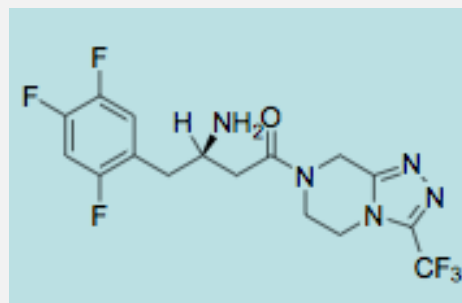
Transaminacja

- Mechanizm składa się z trzech etapów:
 - w stanie spoczynkowym PLP związany jest z grupą NH_2 Lys enzymu
 - w obecności aminokwasu tworzy się addukt PLP-aminokwas, aldimina lub zasada Schiff'a, który chwilowo wypiera Lys
 - w wyniku przegrupowania i hydrolizy uwalnia się 2-oxokwas oraz powstaje fosforan pyridoxoaminy
 - w kolejnym etapie reakcja zachodzi w przeciwnym kierunku



Znaczenie przemysłowe

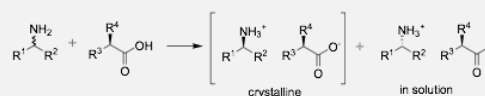
- W ponad 70% produktów farmaceutycznych występują chiralne związki.
- Aminy stanowią wygodne punkty wyjścia dla syntezy związków optycznie czynnych.



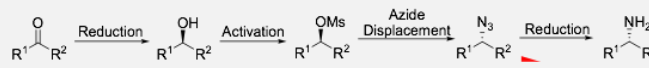
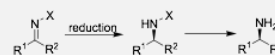
179 Thalidomide

Otrzymywanie czystych izomerów

- Ko-krystalizacja z chiralnymi aminokwasami.
PROBLEM: utrata 50% materiału!



- Aminacja redukcyjna.
PROBLEM:
- kłopotliwe otrzymywanie materiału wyjściowego
- usunięcie podstawnika X



Potencjał transaminaz

- ▶ Naturalnym substratem dla tej grupy są α -amino kwasy i α -keto kwasy
- ▶ ω -transaminazy stanowią szczególną grupę amino transaminaz zdolnych do przemiany prawie każdego ketonu/aldehydu w odpowiadającą im aminę.

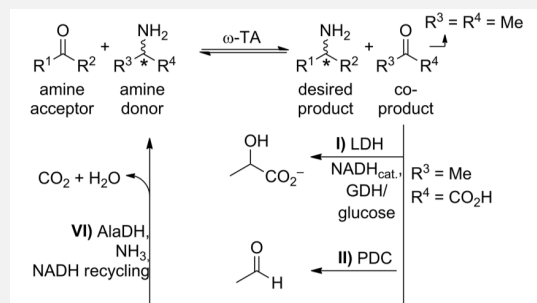
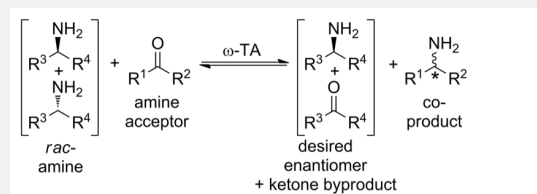


Jamal

181

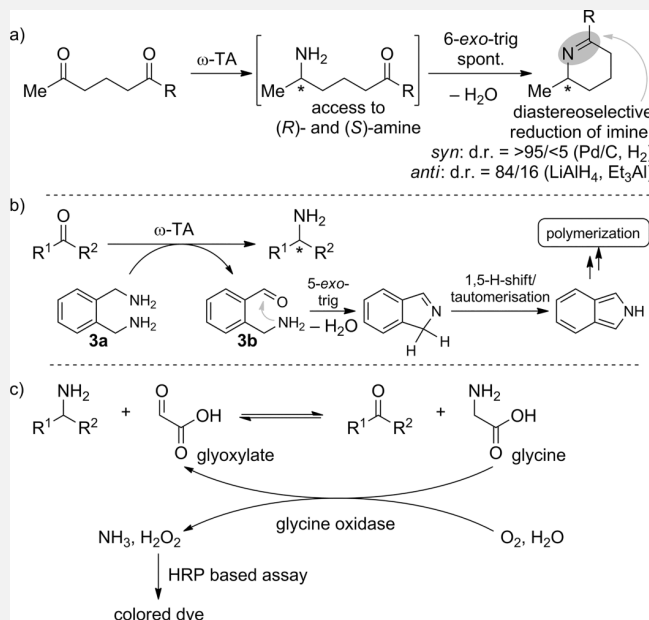
Strategia wykorzystania TA

- ▶ Rozdział kinetyczny w oparciu o odwracalność reakcji.
- ▶ Synteza asymetryczna w oparciu o prochiralny keton



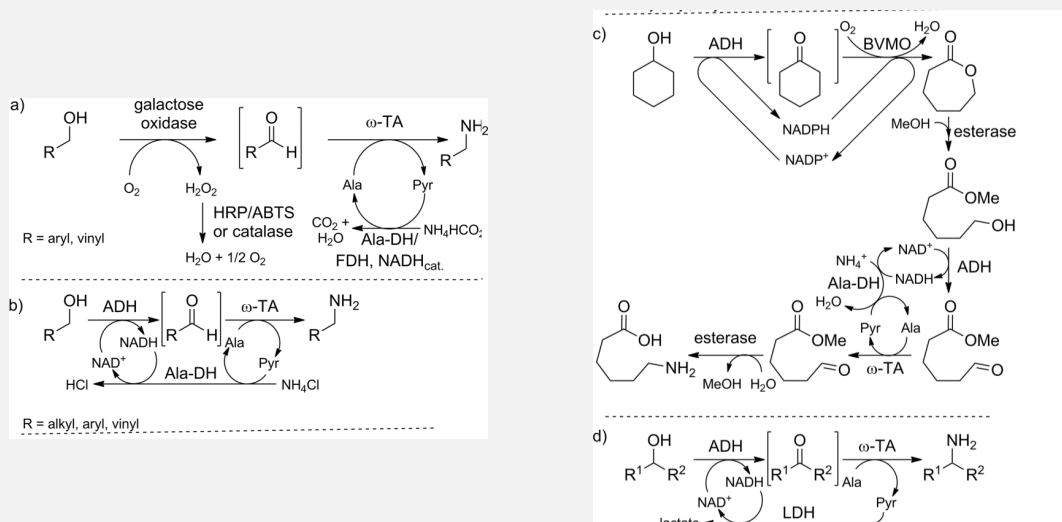
182

Strategia wykorzystania TA



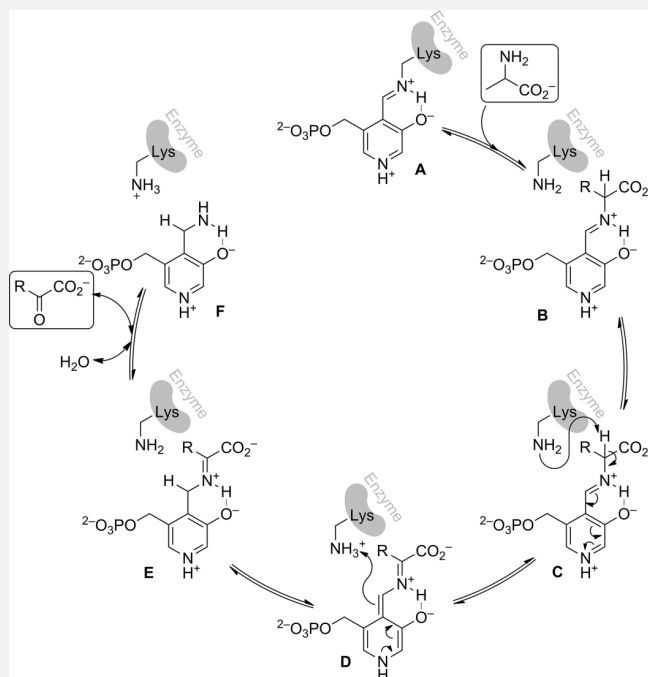
a) Regioselective monoamination of diketones for the diastereoselective synthesis of dihydropyridines. b) Screening assay with *ortho*-xylylenediamine as amine donor. c) Screening method with a glycine oxidase coupled with a HRP-based colorimetric assay.

Strategia wykorzystania TA

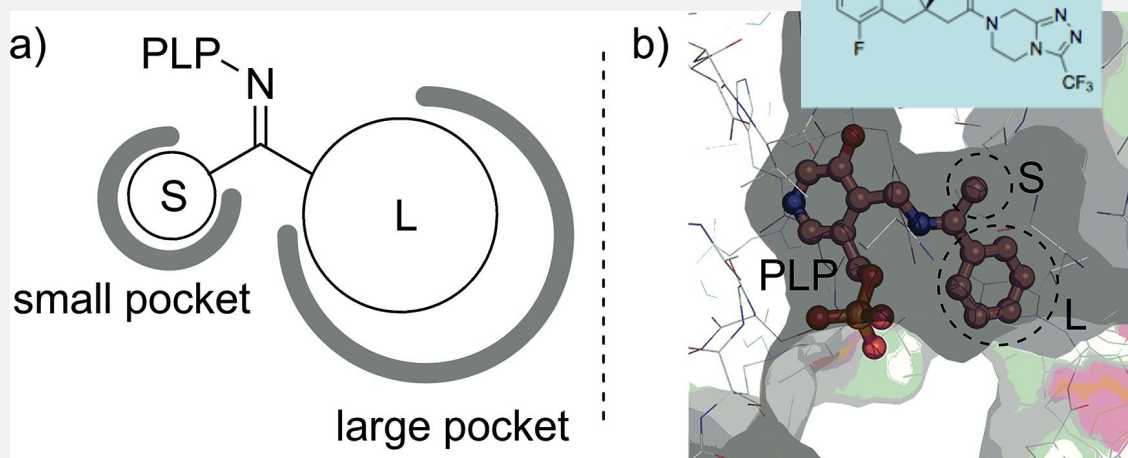


Ala = alanine. Pyr = pyruvate. Ala-DH = alanine dehydrogenase. ADH = alcohol dehydrogenase. NAD⁺/NADH = nicotinamide adenine dinucleotide cofactor (oxidized/reduced form). BVMO = Baeyer-Villiger monoxygenase. NADP⁺/NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide

Mechanizm TA



Miejsce aktywne



a) Schematic view of the binding site.

b) Active site of the ω -TA from *Pseudomonas putida* with pre-optimized, docked substrate-PLP complex [PDB entry

3a8u].



Inżynieria Biłek Terapeutycznych

Zastosowanie praktyczne

Zastosowanie praktyczne

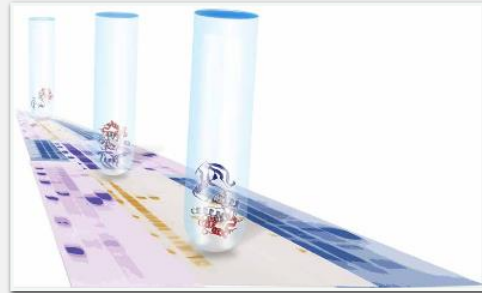
- 'Green chemistry'...
wykorzystanie enzymów w procesach przemysłowych w celu redukcji negatywnego wpływu na środowisko.
- Jakość produktów...
reakcje katalizowane enzymatycznie mają liczne zalety w porównaniu do klasycznych procesów chemicznych.
- Środki terapeutyczne...

Schemat działania

- Problem...
 - Identyfikacja białko poszukiwanej aktywności.
 - Charakterystyka białek *in-vivo* oraz *in-silico*.
 - Projektowanie konstruktów białkowych uwzględniających wymagania przemysłowe:
 - wydajność;
 - stabilność;
 - łatwość pozyskania.

Przygotowanie próbek

- Zastosowania laboratoryjne jak i przemysłowe wymagają przygotowania próbek o odpowiedniej charakterystyce.
- Siłą determinującą postępowanie w trakcie przygotowania próbek jest jej wykorzystanie, np.:
 - proteomika;
 - genomika;
 - zastosowania kliniczne;
 - badania poziomy ekspresji;
 - lokalizacja;
 - badania strukturalne;
 - badania funkcjonalne.



Do rozważenia...

- Przed przystąpieniem do produkcji należy rozważyć:
 - zastosowanie przygotowywanej próbki;
 - metodykę stosowanych metod analitycznych z uwzględnieniem:
 - posiadanej wiedzy o danym białku => *bioinformatyka*;
 - możliwych źródeł pozyskania próbki;
 - poznać próbkę:
 - jak skomplikowana jest próbka;
 - jakie są potencjalne zanieczyszczenia;
 - co wpływa na aktywność/stabilność próbki.
 - jak analizować badaną próbkę:
 - jakie są dostępne metody analityczne;
 - jaka jest odpowiedź próbki.

Źródła rekombinowanych białek

- W zależności od rodzaju białka można je produkować w:

- bakteriach;
- drożdżach;
- komórkach owadzych;
- komórkach ssaczy;

- W celach analitycznych dostępne są dodatkowo:

- wirusy;
- nierekombinowane bakterie;
- nierekombinowane drożdże;
- pierwotne linie komórkowe;
- ssacze linie komórkowe (w tym ludzkie);
- tkanki zwierzęce;
- tkanki roślinne;
- płyny ustrojowe

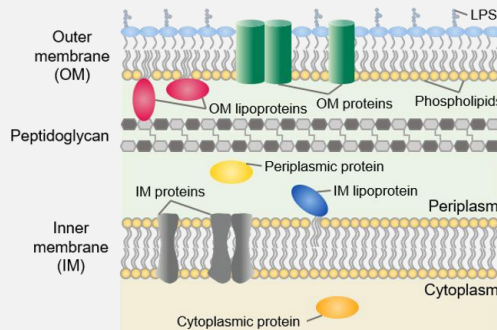
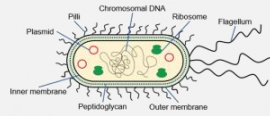
- Problem: Poszukiwane białko może stanowić zaledwie 1% wszystkich białek obecnych w komórkach!

Charakterystyka organizmów wykorzystywanych do produkcji białek rekombinowanych

Characteristics	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Growth speed	Fast ($T_d \sim 20-30$ min)	Fast ($T_d \sim 90$ min)	Slow ($T_d \sim 24-30$ h)	Slow ($T_d \sim 24-30$ h)
Growth medium	Simple Cheap	Simple Cheap	Complex Expensive	Complex Expensive
Expression level	High	Low – High	Low – High	Low – Moderate
Secretion	Periplasm	Medium	Medium	Medium
Post-translational modifications				
N-linked glycosylation	no	yes (high mannose)	yes (simple, no sialic acid)	yes (complex)
O-linked glycosylation	no	yes	yes	yes
Phosphorylation	no	yes	yes	yes
Acylation	no	yes	yes	yes
Acetylation	no	yes	yes	yes
g-carboxylation	no	no	no	yes

Characteristics of commonly used host organisms for protein production.

E. coli

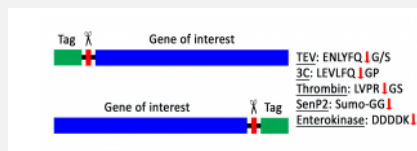


• Zalety ekspresji bakteryjnej:

- Cytoplasma
- Periplasma
 - Formowanie mostków dwusiarczkowych,
 - Oksydoreduktazy, DsbA/DsbB
 - Izomerazy mostków dwusiarczkowych, DsbC/DsbD
 - Kontrola aktywności proteolitycznej,

• Periplasma zawiera około 4% całkowitej zawartości białek!

Białko rekombinowane...



• Charakterystyka bioinformatyczne:

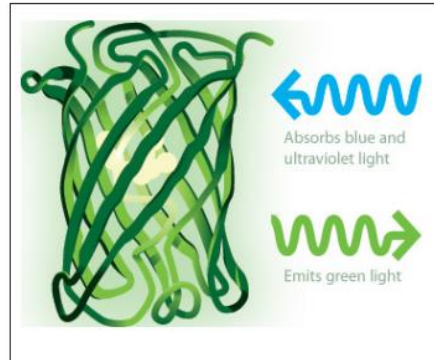
- Expasy
- Clustal Omega
- SignalP

• Dodatki:

- Etykiety powinowactwa: His6, StrepII, twinStrepII, Flag, Myc, HA, SPOT, ...
- Etykiety poprawiające rozpuszczalność: SUMO, Trx, NusA, DsbA, DsbC, ...
- Etykiety do analiz (np. biofizycznych): eGFP, mCherry, YFP, CFP, ... HALO, SNAP, CLIP



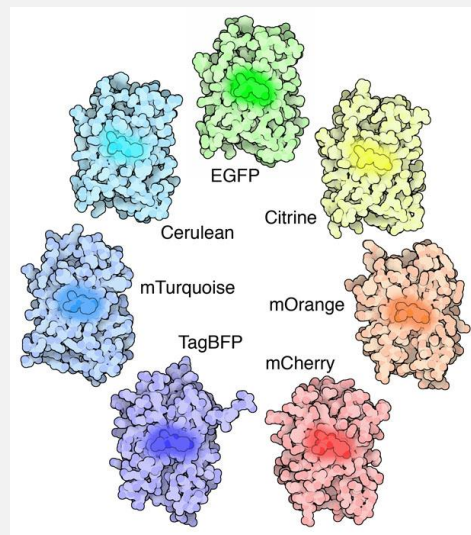
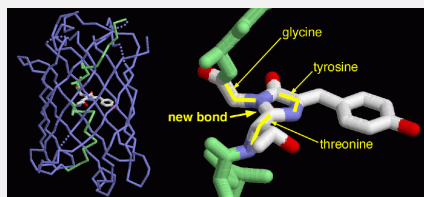
Photo of Aequorea victoria, Kevin Bascoff

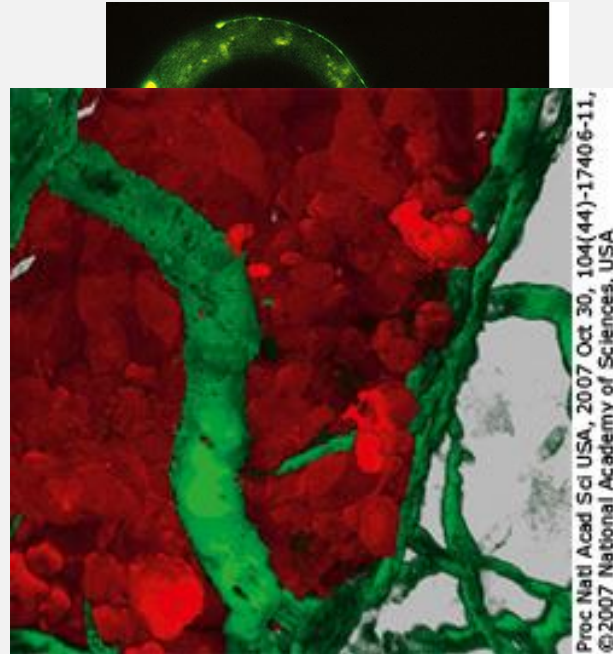
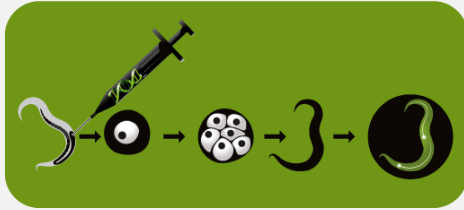


A green guiding star for biosciences

Today, scientists use GFP to understand the function of cells and proteins in living creatures. Proteins are the chemical tools of life – they control most of what happens within a living cell. Every human being functions thanks to the well-oiled machinery of thousands of proteins, like haemoglobin, antibodies and insulin. If something malfunctions, illness and disease often follows. Therefore it is fundamental for the biosciences to map out the role of various proteins. Using DNA-technology, scientists connect GFP to interesting, but otherwise invisible, proteins. GFP functions like a little lantern, which is activated by ultraviolet light. The green glow helps scientists track these proteins in the body.

GFP





Etykiety powinowactwa

Published: 14 June 2007

The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins

Thomas GM Schmidt & Arne Skerra

Nature Protocols 2, 1528–1535 (2007) | [Cite this article](#)

35k Accesses | 453 Citations | 21 Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

The *Strep*-tag II is an eight-residue minimal peptide sequence (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) that exhibits intrinsic affinity toward streptavidin and can be fused to recombinant proteins in various fashions. We describe a protocol that enables quick and mild purification of corresponding *Strep*-tag II fusion proteins—including their complexes with interacting partners—both from bacterial and eukaryotic cell lysates using affinity chromatography on a matrix carrying an engineered streptavidin (*Strep*-Tactin), which can be accomplished within 1 h. A high-affinity monoclonal antibody (*Strep*MAB-Imm) permits stable immobilization of *Strep*-tag II fusion proteins to solid surfaces, for example, for surface plasmon resonance analysis. Selective and sensitive detection on western blots is achieved with *Strep*-Tactin/enzyme conjugates or another monoclonal antibody (*Strep*MAB-Classic). Thus, the *Strep*-tag II, which is short, biologically inert, proteolytically stable and does not interfere with membrane translocation or protein folding, offers a versatile tool both for the rapid isolation of a functional gene product and for its detection or molecular interaction analysis.

Figure 1: Schematic illustration of the *Strep*-tag purification cycle.

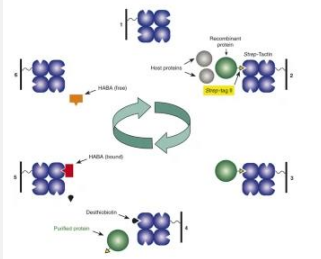
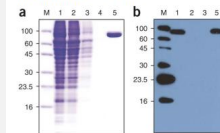


Figure 2: Purification of rhtTGase from a mammalian cell lysate.



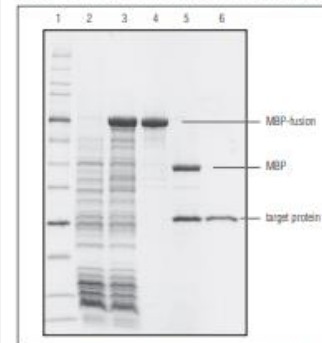
Etykiety powinowactwa

NEBExpress MBP Fusion and Purification System

E. coli

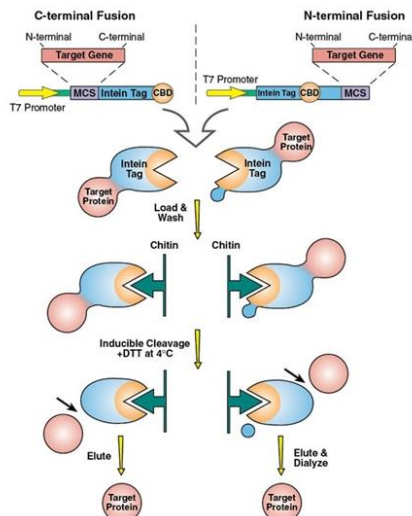
This system takes advantage of the strong P_{lac} promoter and the translation initiation signals of maltose binding protein (MBP) to enhance solubility and expression levels of a desired protein in *E. coli*. The resulting product is an MBP fusion protein, which is then purified by affinity chromatography.

Protein Expression using the NEBExpress MBP Fusion and Purification System



SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of fractions from the Amylose affinity purification of MBP6-TEV-paramyosin Δ Sal.

Schematic Illustration of IMPACT System



IMPACT Kit

E. coli

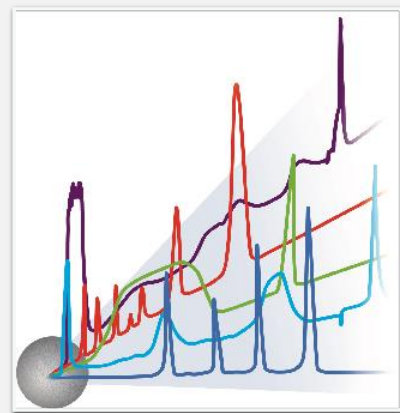
This *E. coli* expression system utilizes engineered protein splicing elements (inteins) fused to a chitin binding domain (CBD) as affinity tags. This allows the recombinant protein to be purified in a single chromatographic step. The target protein can be fused at the C- or N- terminus, maximizing the probability of successful expression and purification.

Oczyszczanie białek

- To *pierwszym niezbędnym* etapem.
- Proces oczyszczania opiera się o cechy charakterystyczne białka:
 - rozpuszczalność;
 - wielkość;
 - ładunek;
 - zdolność wiązania.

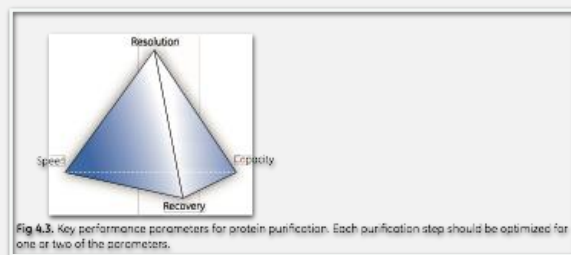
Techniki oczyszczania

- Historyczne:
 - filtracja;
 - wytrącanie;
 - krystalizacja.
- Chromatografia:
 - powinowactwowa (AC);
 - jonowymienna (IEX);
 - odwróconych faz(RPC);
 - oddziaływań hydrofobowych (HIC);
 - powinowactwa do jonów metali (IMAC).



Strategie oczyszczania

- ▶ Etap I: izolacja z komórek.
Po wykryciu aktywności poszukiwanego enzymu można rozpocząć frakcjonowanie zawartości na składniki. Proces ten składa się z:
 - homogenizacji;
 - oddzielenia w procesie wirowania frakcji nierozpuszczalnej;
 - oczyszczania właściwego.



Techniki oczyszczania

Protein property	Method
Specific ligand recognition (biospecific or nonbiospecific)	Affinity chromatography (AC)
Metal ion binding	Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)
Charge	Ion exchange chromatography (IEX)
Size	Gel filtration (GF)
Hydrophobicity	Hydrophobic interaction chromatography (HIC) Reversed phase chromatography (RPC)
Isoelectric point	Chromatofocusing

Wydajność metod

► Parametry charakteryzujące metody chromatograficzne:

- rozdzielczość
jak wydajnie metoda jest w stanie rozdzielić podobne białka.
- pojemność
ile materiały metoda pozwala rozdzielić w czasie jednego cyklu.
- selektywność
jak bardzo wybiórcza jest metoda.

Method	Typical characteristics		Purification phase			Sample start conditions	Sample end conditions
	Resolution	Capacity	Capture	Intermediate	Polishing		
AC	+++ or ++	+++ or ++	+++	++	+	various binding conditions	Specific elution conditions
IMAC	+++	++	+++	++	+	For purifying histidine-tagged proteins using Ni-Sepharose columns: 20-40 mM imidazole; pH > 7; 500 mM NaCl, no chelators Other proteins: low concentration of imidazole	High concentration of imidazole, pH > 7, 500 mM NaCl
GE	++	+	+		+++	Most conditions acceptable, limited sample volume	Buffer exchange possible, dilute sample
EX	+++	+++	+++	+++	+++	Low ionic strength, pH depends on protein and EX type	High ionic strength or pH changed
HIC	+++	++	++	+++	+++	High ionic strength, addition of salt required	Low ionic strength
Chromato-focusing	+++	+			++	Low ionic strength	Polyluffer Low ionic strength
RPLC	+++	++		+	++	Ion-pair reagents and organic modifiers may be required	Organic solvents (risk for loss of biological activity)

IMAC

- IMAC wykorzystuje powinowactwo białek do specyficznych grup chemicznych.
 - białka mające powinowactwo do maltozy;
 - białka mające powinowactwo do DNA.
- Przebieg oczyszczania:
 - przyłączenie grupy X lub jej pochodnej do nośnika kolumny;
 - nałożenie mieszaniny białek na kolumnę;
 - płukanie kolumny;
 - selektywne wypłukanie białka poprzez dodanie roztworu z grupą X lub substancją wiążącą się z nią.
- Chromatografia białek zrekombinowanych z etykietką His.

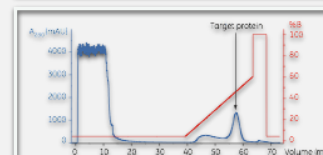
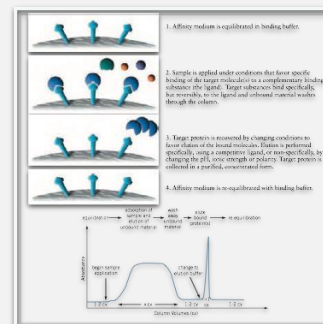


Fig 2.3. Typical IMAC purification with gradient elution.

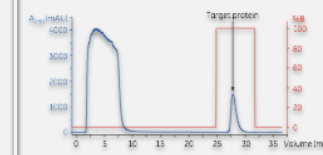


Fig 2.4. Typical IMAC purification with step elution.

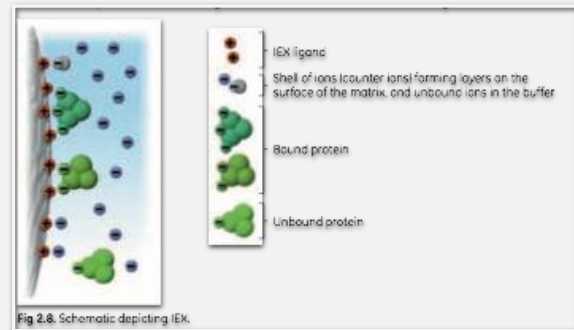
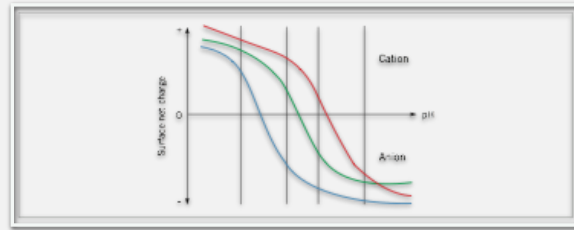
IEX

► IEX wykorzystuje różnice w wypadkowym ładunku powierzchniowym białek w procesie ich oczyszczania.

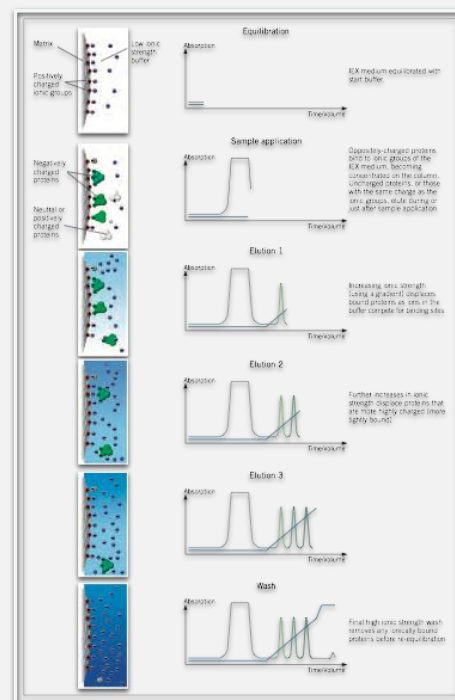
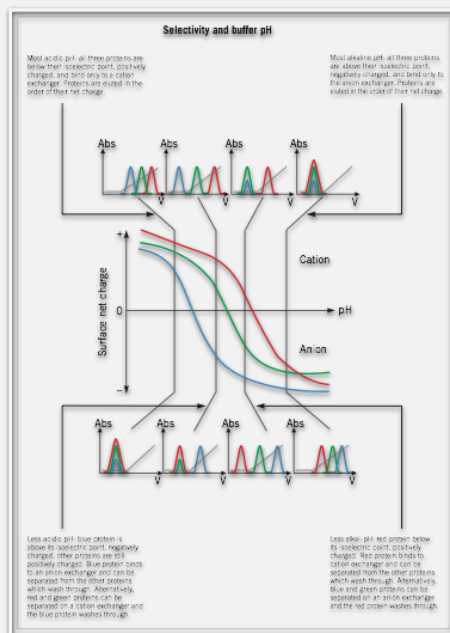
► Przebieg oczyszczania:

- wybór kolumny *kationowej* lub *anionowej*;
- nałożenie mieszaniny białek;
- selektywne wypłukiwanie roztworem o *zwiększającym* się stężeniu jonów.

► *Zależność ładunku od pH.*

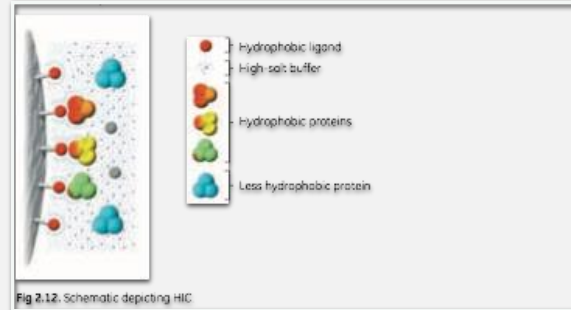


IEX

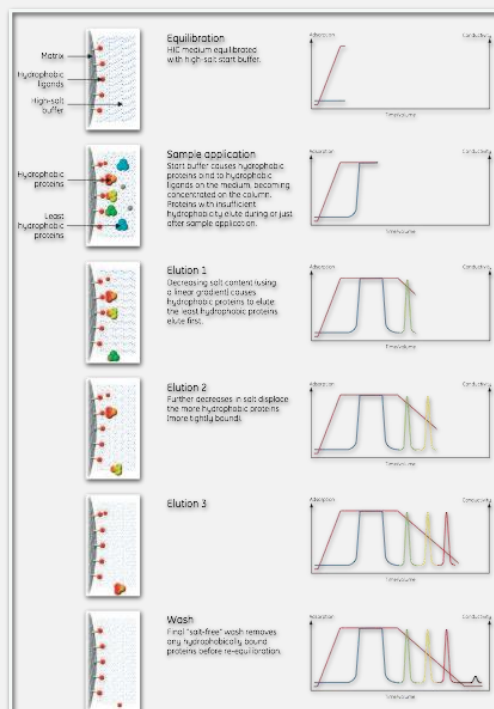


HIC

- ▶ HIC wykorzystuje różnice w wypadkowym charakterze hydrofobowym powierzchni białek w procesie ich oczyszczania.
- ▶ Przebieg oczyszczania:
 - wybór kolumny;
 - nałożenie mieszaniny białek;
 - selektywne wypłukiwanie roztworem o *zmniejszającym się* stężeniu jonów.

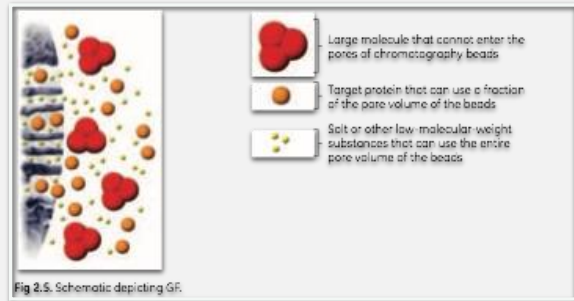


HIC



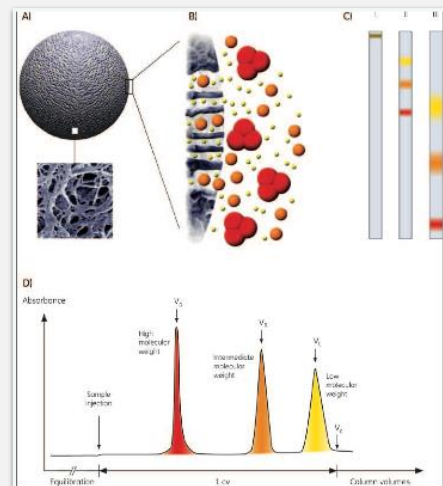
GF

- GF wykorzystuje różnicę w wielkości białek w celu ich rozdzielania na porowatym materiale złoża.



GF

- Przebieg oczyszczania:
 - wybór kolumny;
 - nałożenie mieszaniny białek;
 - wypłukiwanie roztworem.



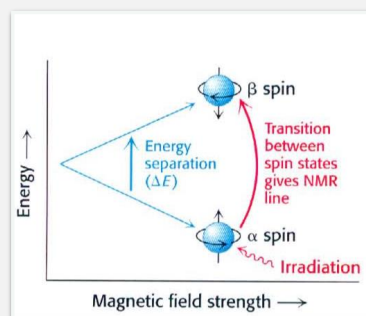
Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Podstawa:

niektóre jądra atomowe wykazują właściwości magnetyczne.

różnica energii *spinów* jest proporcjonalna do siły przyłożonego pola magnetycznego.

rozszczenie energii jest zależne od środowiska.



Źródła sygnału

Naturalnie występujące izotopy pierwiastków o znaczeniu biologicznym.

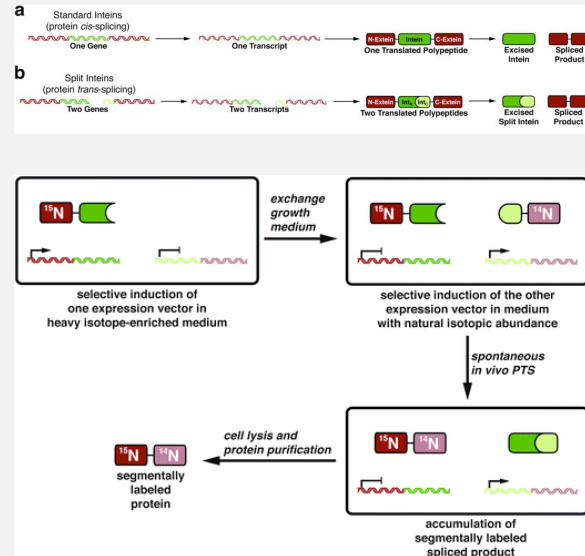
Nucleus	Natural abundance (% by weight of the element)
¹ H	99.984
² H	0.016
¹³ C	1.108
¹⁴ N	99.635
¹⁵ N	0.365
¹⁷ O	0.037
²³ Na	100.0
²⁵ Mg	10.05
³¹ P	100.0
³⁵ Cl	75.4
³⁹ K	93.1

Wzbogacanie składu izotopowego

Skład izotopowy białek musi być wzbogacony w trakcie syntezy białek.

zastosowanie pożywek o zmodyfikowanym składzie izotopowym oraz odpowiednich szczepów ekspresyjnych.

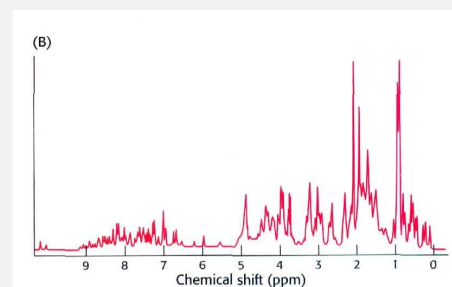
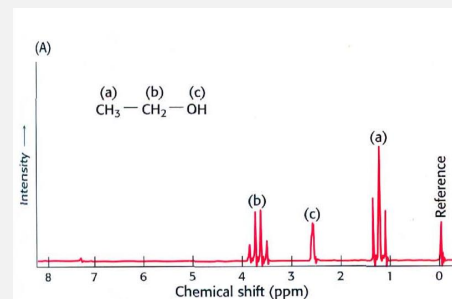
znakowanie domen.



Pomiar

Stężona próbka białka:

1 mM lub 15 mg/ml⁻¹ dla białka 15 kDa



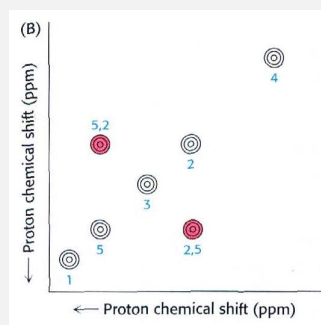
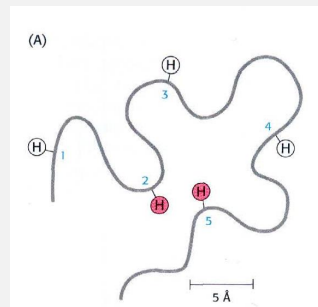
Pomiar

Uproszczenie widma NMR osiąga się poprzez zastosowanie odpowiednich metod pomiarowych:

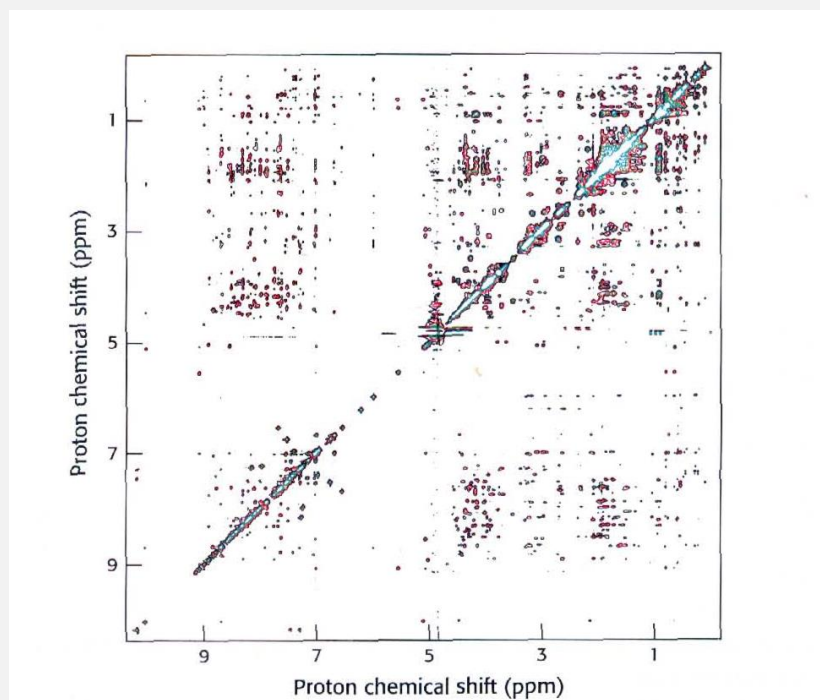
jądrowego efektu Overhausera (NOE) w technice spektroskopii jądrowego efektu Overhausera (NOESY);

spektroskopii korelacyjnej (COSY);

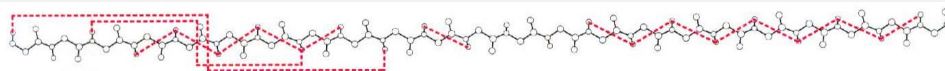
całkowitej spektroskopii korelacyjnej (TOCSY)



Analiza



Analiza

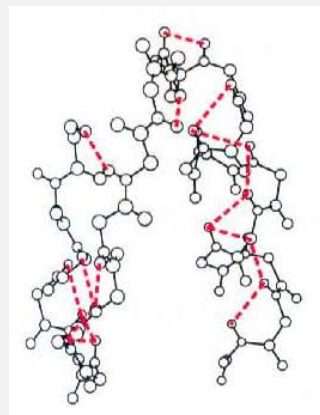


W trakcie interpretacji widm (ręcznej lub automatycznej) stosuje się następujące typy ograniczeń:

odległości;

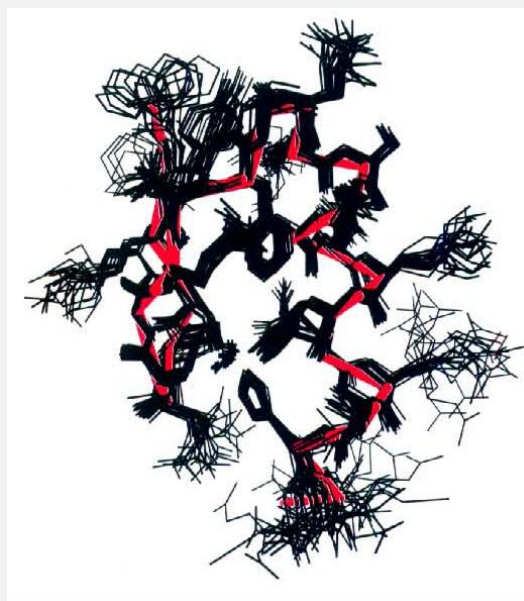
kątów;

orientacji przestrzennej.

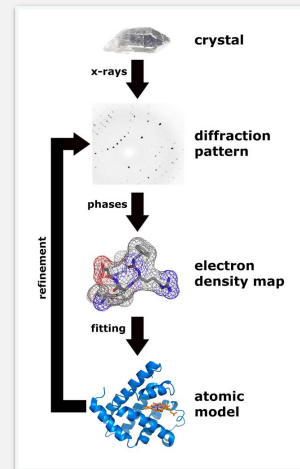


Wynik

Wynikiem pomiarów jest rodzina struktur.

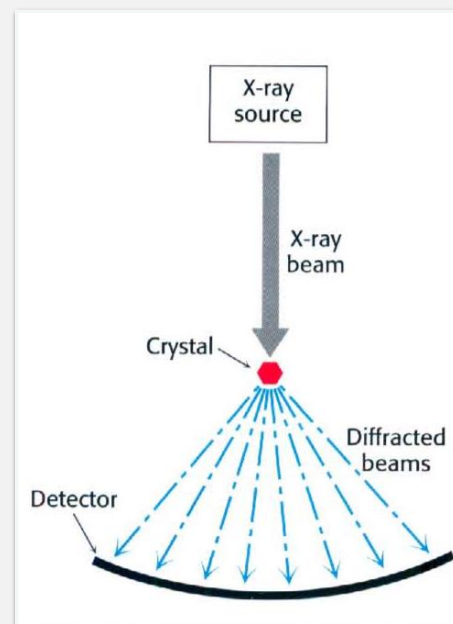


Etapy wyznaczania struktury



Krystalografia rentgenowska

To pierwsza i ciągle najczęściej wykorzystywana metoda oznaczania struktury przestrzennej białka na poziomie atomowym.



Kryształ

Kryształ

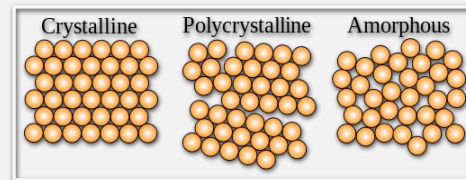
to materiał, którego materiał na poziomie atomów/ionów/cząsteczek jest rozmieszczony w regularny i powtarzalny sposób.

Kryształizacja białek

proces poszukiwanie selektywnych, indywidualnych warunków kryształizacji białka poprzez:

wysalanie;

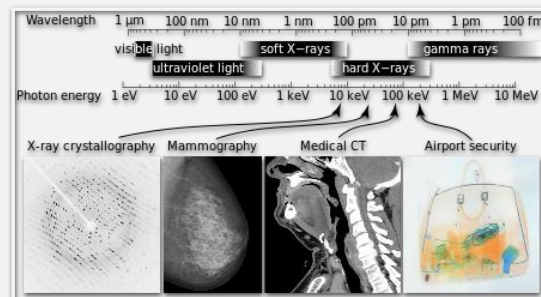
metody przesiewowego badania różnych warunków.

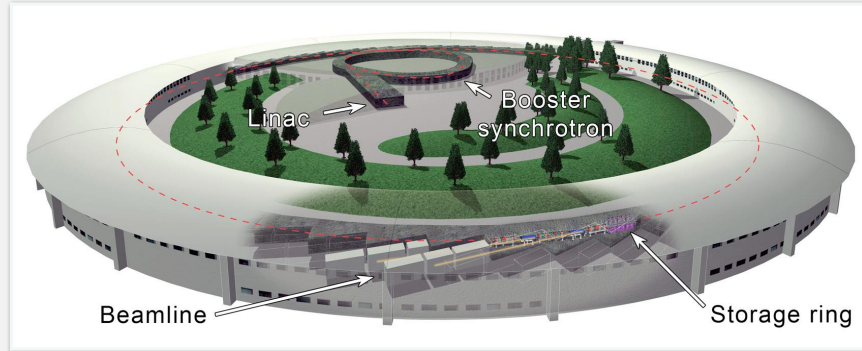
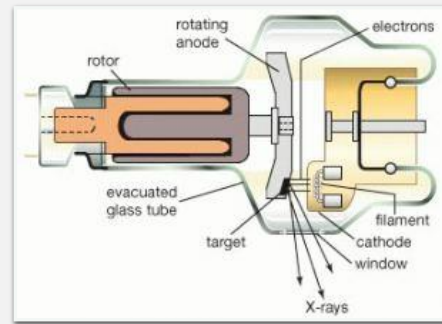


Promieniowanie rentgenowskie

Promieniowanie w zakresie 0.1-10 nm (100 eV-100keV).

Dlaczego nie można stosować światła widzialnego?



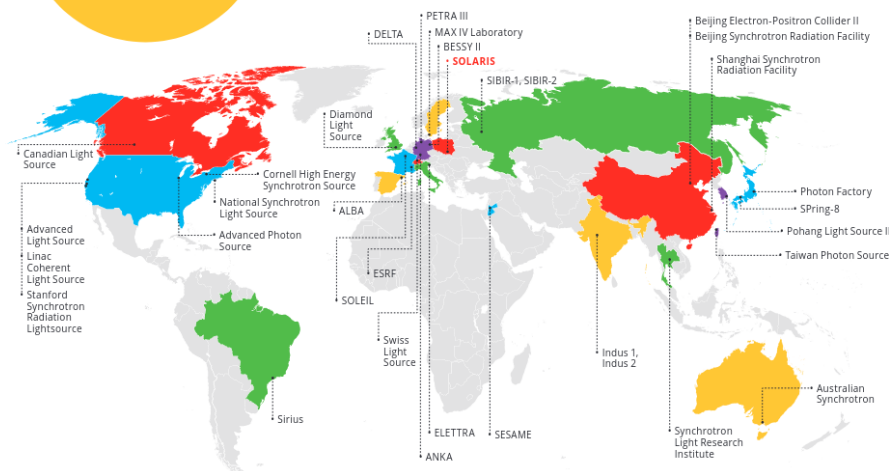


Wiele pomiarów można przeprowadzić wyłącznie w ośrodkach synchrotronowych. Synchrotrony pozwalają również zdobyć w krótszym czasie więcej lepszych jakościowo informacji niż przy użyciu tradycyjnych źródeł światła, a przy tym **działają siedem dni w tygodniu, 24 godziny na dobę. Ponadto naukowcy mogą prowadzić w nich badania na wielu stanowiskach jednocześnie.**

Ośrodki synchrotronowe to fabryki badań, w których analizuje się próbki różnych materiałów, głównie ciał stałych.

Światło synchrotronowe wykorzystywane jest przez wiele dziedzin nauki, takich jak biologia, chemia, fizyka, inżynieria materiałowa, nanotechnologia, medycyna, farmakologia, geologia czy krytalografia.

Obecnie na świecie działa około 30 ośrodków synchrotronowych. Najwięcej z nich znajdziemy w Europie, Azji Wschodniej oraz Stanach Zjednoczonych, czyli w regionach wysoko rozwiniętych, których rozwój gospodarczy opiera się na wiedzy i innowacjach.



Narodowe Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS

[CENTRUM](#)
[UŻYTKOWNICY](#)
[AKCELERATORY](#)
[LINIE BADAWCZE & CRYO-EM](#)
[PRZEKRYŁA](#)
[GOŚCIE I MEDIA](#)

CENTRUM SOLARIS

WAŻNE STRONY

- [Digital User Office \(DUO\)](#)
- [Status synchrotrona](#)
- [Kariera w SOLARIS](#)
- [Wyżywienie i otoczenie](#)
- [Monitoring wizyjny](#)
- [Zamówienia publiczne](#)
- [Kontakt](#)

AKTUALNOŚCI



International Day of Light
16 May

Międzynarodowy Dzień Światła - kariera naukowa

BADANIA

Electronic structure studies of Chiral Quantum Materials




Badania struktury elektronowej chiralnych materiałów kwantowych

Narodowe Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS

[CENTRUM](#)
[UŻYTKOWNICY](#)
[AKCELERATORY](#)
[LINIE BADAWCZE & CRYO-EM](#)
[PRZEKRYŁA](#)
[GOŚCIE I MEDIA](#)

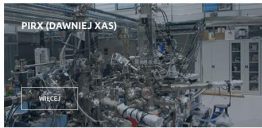
dr hab. Jacek Szczerbko, prof. UJ
 Zastępca Dyrektora ds. Naukowych
 tel.: 12 664 40 81, 669 428 912
 e-mail: j.szczerbko@poczta.umk.pl

URANOS (DAWNIEJ UARPES)




WIĘCEJ

PIRX (DAWNIEJ XAS)



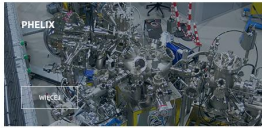
WIĘCEJ

DEMETER




WIĘCEJ

PHELIX



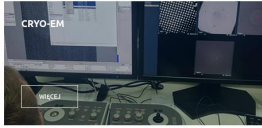
WIĘCEJ

ASTRA (DAWNIEJ SOLABS)



WIĘCEJ

CRYO-EM



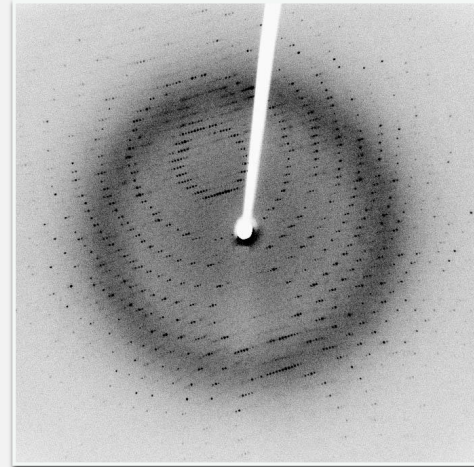
WIĘCEJ

Linie budowane

Pomiar

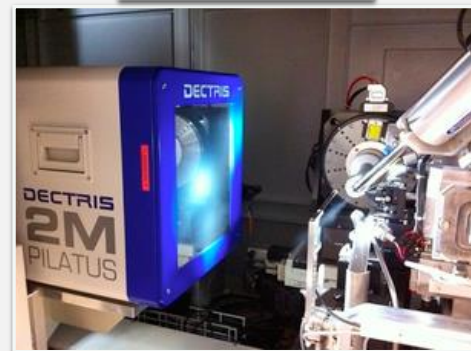
Promieniowanie rentgenowskie ulega rozszczepieniu na elektronach atomów.

Rozproszone fale nakładają się tworząc obraz interferencyjny, na którym wzmocnienie lub wygaszenie fali jest zależne od rodzaju i położenia atomu w kryształach.



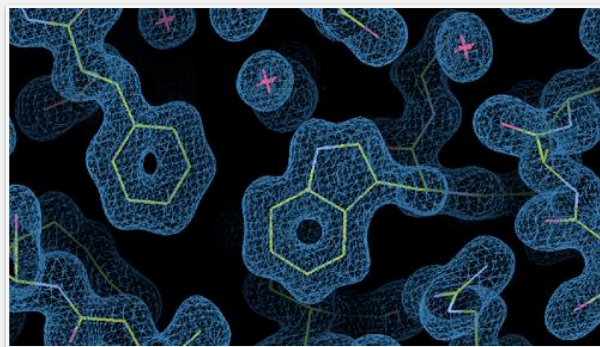
Detektor

Historycznie rolę detektora spełniała klisza fotograficzna.

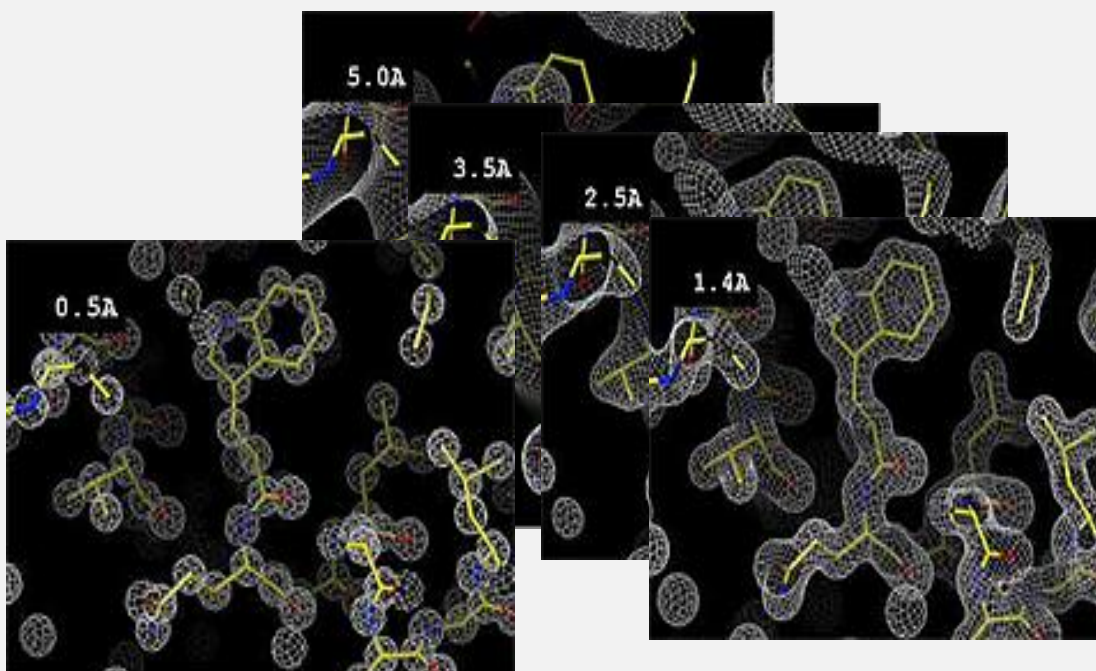


Analiza wyników

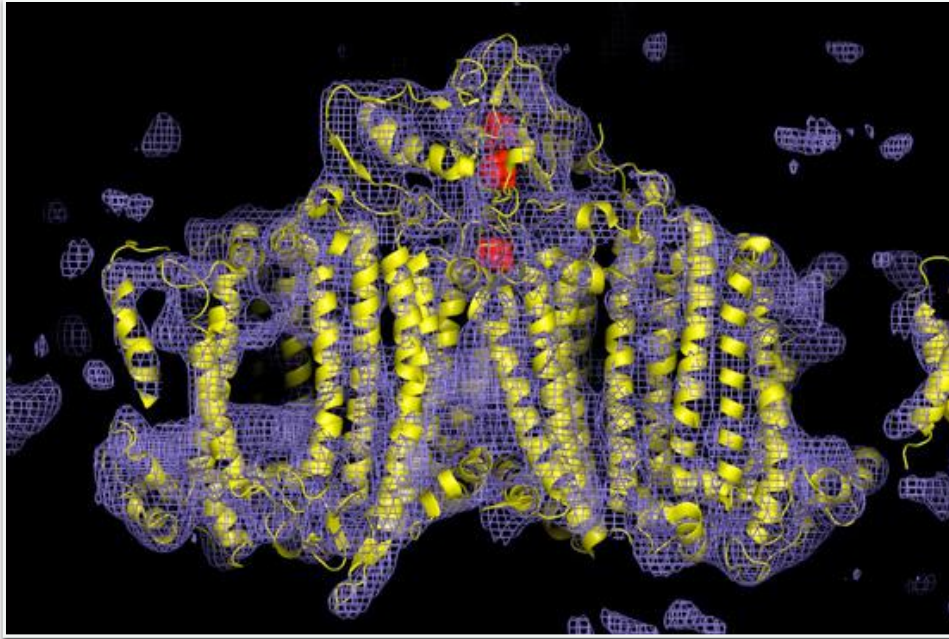
Po wstępnej analizie (indeksacji) dane poddawane są przekształceniu Fouriera. W jego wyniku otrzymuje się mapę elektronową, którą musi zostać zinterpretowana.



Rozdzielczość



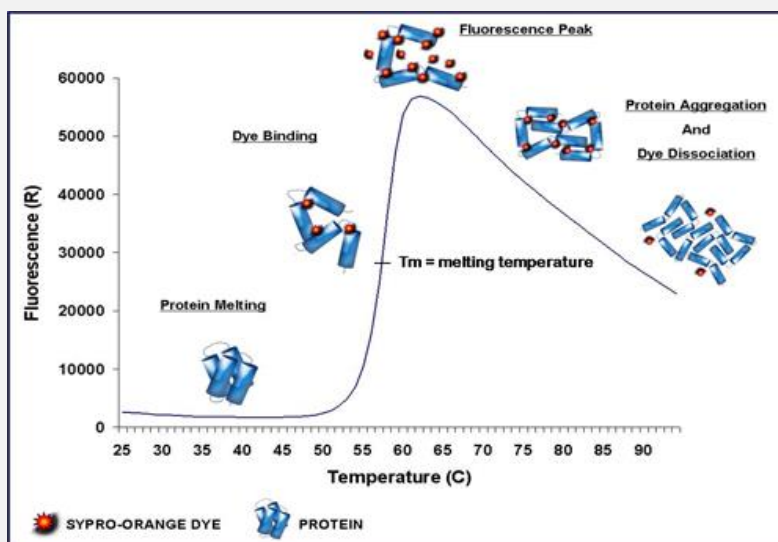
Struktura 3D



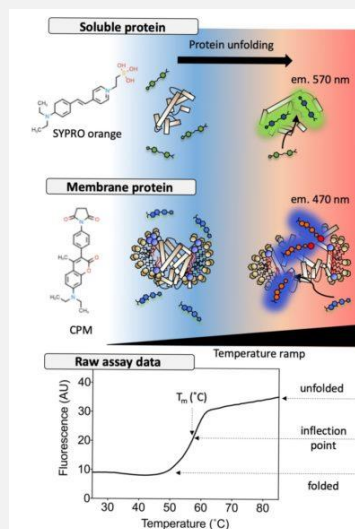
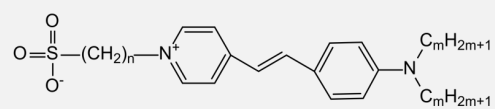
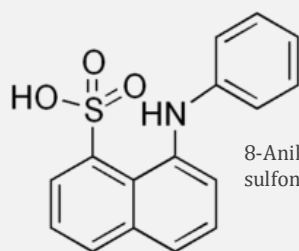
- Kryształ *vs.* roztwór.
- Pojedyncza struktura *vs.* rodzina.
- Statyczny obraz *vs.* obraz dynamiczny.

- Dowolny rozmiar cząsteczki *vs.* limit masy cząsteczkowej.

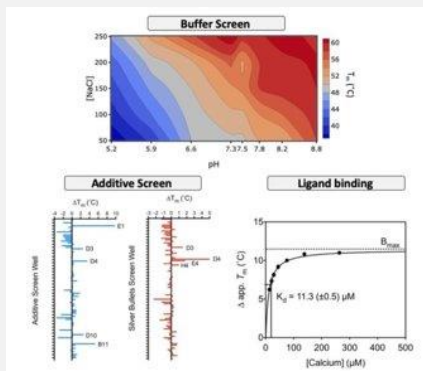
Thermofluor (DSF)



DSF

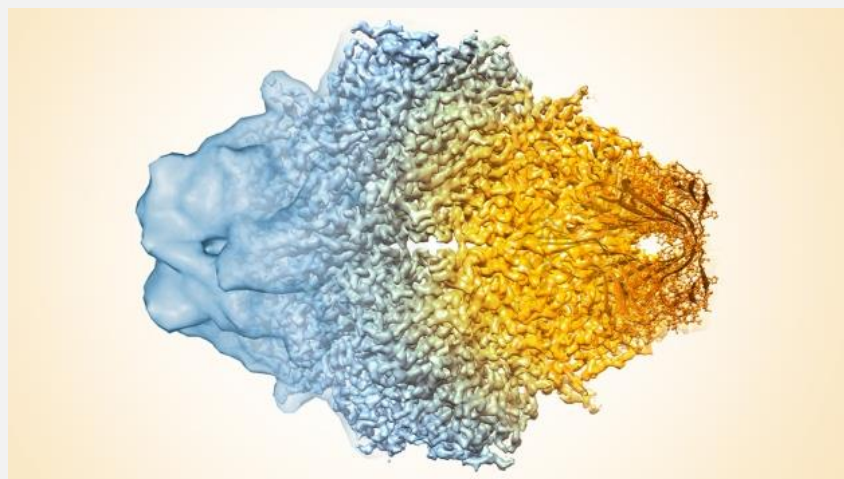


DSF

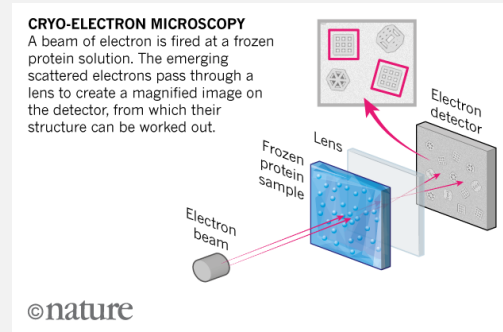
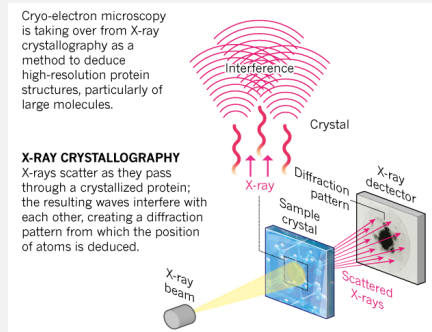


- Label-free drug screening
- Drug lead optimization
- Studies of enzyme mechanism
- Protein stabilization for optimized isolation
- Characterization of engineered proteins
- Screening for inhibitors of protein-protein interactions of modulators of protein conformational changes
- Decrypting proteins of unknown biological function[edit]
- The biochemical function of protein targets identified through gene
- Optimization of protein crystallization conditions

from the low-resolution density map to the atomic coordinates



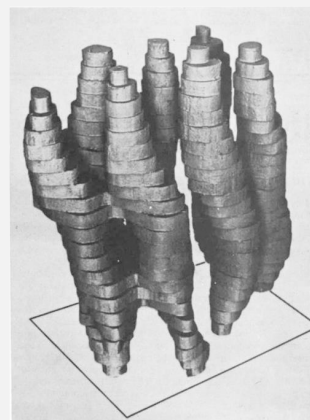
Metody eksperymentalne



Transmission electron microscopy, as the technique is called, works more or less like ordinary microscopy, but a beam of electrons is sent through the sample instead of light. The electrons' wavelength is much shorter than that of light, so the electron microscope can make very small structures visible – even the position of individual atoms.

Problemy

- The intense electron beam necessary for obtaining high resolution images incinerates biological material and, if the beam is weakened, the image loses its contrast and becomes fuzzy.
- Electron microscopy requires a vacuum, a condition in which biomolecules deteriorate because the surrounding water evaporates.

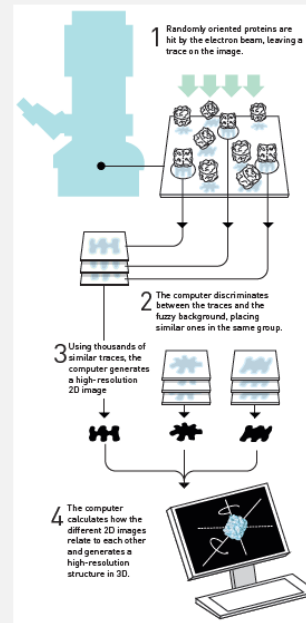


The first rough model of bacteriorhodopsin, published in 1975. Image from *Nature* 257: 28-32

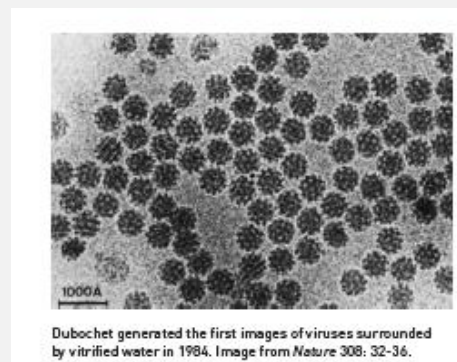
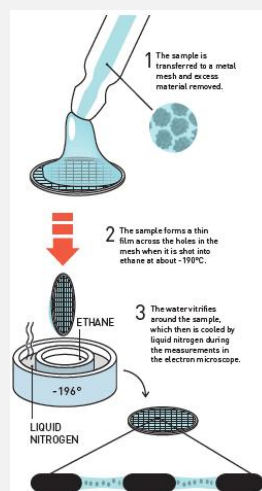
It was the best picture of a protein ever generated using an electron microscope. Many people were impressed by the resolution, which was 7 Ångström (0.0000007 millimetres), but this was not enough for Richard Henderson. His goal was to achieve the same resolution as that provided by X-ray crystallography, about 3 Ångström, and he was convinced that electron microscopy had more to give.

Procedura

1. Komputer rozpoznaje sygnał pochodzący od białek ułożonych w losowych orientacjach w przygotowanej próbce.
2. W oparciu o odpowiednie algorytmy zidentyfikowane znajdują powtarzające się elementy.
3. Zebrane informacje są katalogowane i w ich oparciu powstaje model 2D.
4. Komputer generuje obraz 3D w oparciu o zebrane dane.



Witryfikacja



Initially, the research group attempted to vitrify tiny drops of water in liquid nitrogen at -196°C , but were successful only when they replaced the nitrogen with ethane that had, in turn, been cooled by liquid nitrogen. Under the microscope they saw a drop that was like nothing they had seen before. They first assumed it was ethane, but when the drop warmed slightly the molecules suddenly rearranged themselves and formed the familiar structure of an ice crystal. It was a triumph – particularly as some researchers had claimed it was impossible to vitrify water drops. We now believe that vitrified water is the most common form of water in the universe.

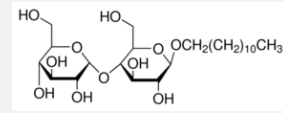
Wyznaczenie struktury GLP1-R

Stabilna biomolekuła

- For cryo-EM studies we used rabbit GLP-1R, which shares 92% identity with the human receptor, as it expressed at higher levels in insect cells than the human or mouse homologue.

Adekwatna stabilizacja

- GLP-1R is very unstable to extraction from membranes using conventional detergents such as DDM (n-dodecyl β -D-maltoside) and MNG (maltose-neopentyl glycol); therefore, we formed the complex between receptor and purified Gs in insect cell membranes before extraction of the GLP-1R-Gs complex with MNG and purification by antibody affinity and size-exclusion chromatography.



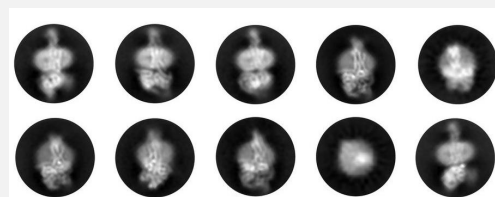
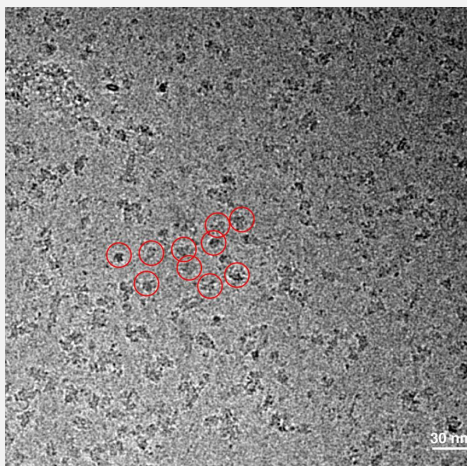
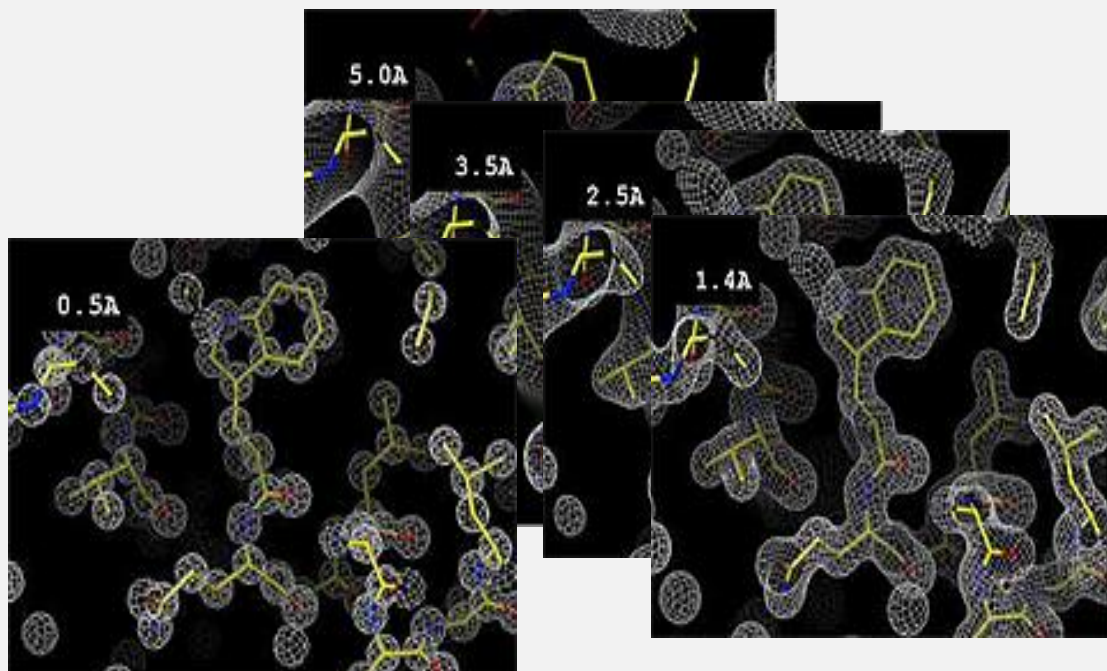
n-Dodecyl β -D-maltoside

D4641-500MG	✔ Dostępny do wysyłki 17.10.17 - Z	194.50 830.25
D4641-1G	✔ Dostępny do wysyłki 17.10.17 - Z	358.00 1,206.00
D4641-5G	✔ Tylko 5 szt. w magazynie (więcej w drodze). - Z	837.00 3,991.50
D4641-25G	✔ Tylko 1 szt. w magazynie (więcej w drodze). - Z	3,640.00 15,930.00

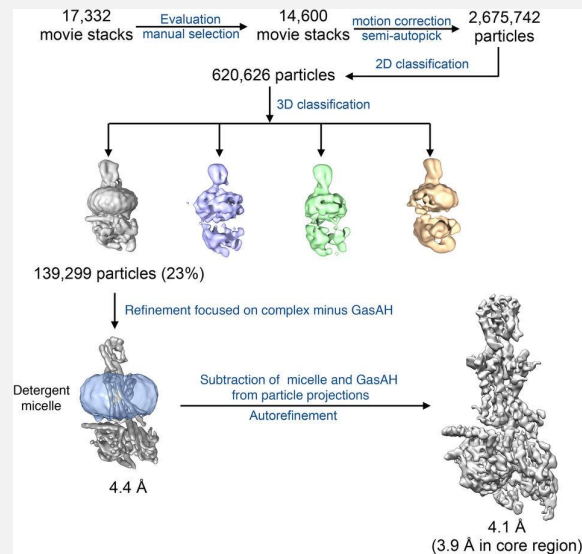
Struktura

- Sample evaluation by negative-stain EM and single-particle averaging confirmed a monodisperse particle population and stable complex formation. Initial cryo-EM experiments suggested that the protein complex avoided areas of thin vitreous ice, and we thus had to image the specimen in relatively thick ice at the expense of increased background noise in the micrographs.
- Refinement and reconstruction of the selected particle projections after subtracting densities for the detergent micelle and the mobile α -helical domain enabled us to obtain a 3D reconstruction of the complex at 4.1 Å global resolution, with 3.9 Å nominal resolution in the core region that includes GLP-1, TMD and the $\alpha 5$ helix of the Gas Ras-like domain.

Rozdzielczość

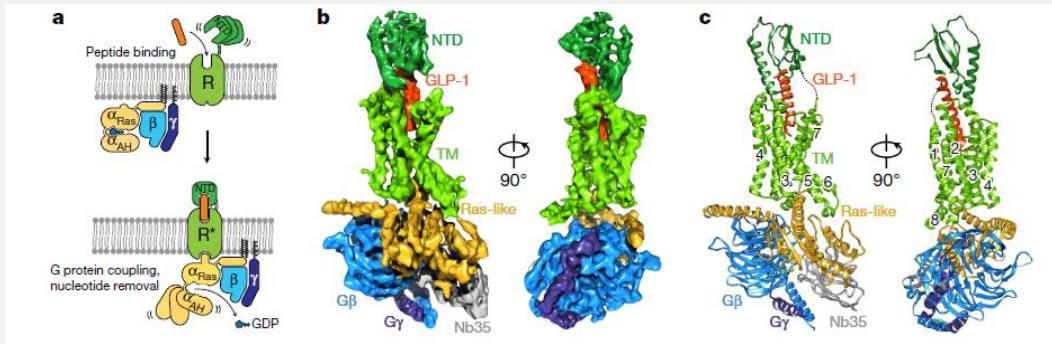


Rekonstrukcja EM



Struktura

- Using the cryo-EM density map we built and refined a near atomic resolution structure of the GLP-1–GLP-1R–Gs complex. Side chains of primarily bulky amino acid residues are clearly identifiable in most transmembrane helices that appear to assume overall stable positions. The only exception is the cytoplasmic half of TM6, whose density is less well-defined compared to the other transmembrane helices, suggesting that this part becomes dynamic in the activated GLP-1R. The GLP-1 peptide is well-resolved, particularly in its N-terminal half that maintains interactions with the transmembrane core. This is also the case for the $\alpha 5$ helix of Gs, the C-terminal part of which is stably interacting with the cytoplasmic part of GLP-1R.
- In addition, the map includes densities for all intracellular and extracellular loops (ECLs). Thus, we could resolve several key interactions of GLP-1R with GLP-1 and heterotrimeric Gs.



a, Schematic of the activation of a class B GPCR by extracellular peptide agonist via a 'two-domain' binding mechanism. AH, α -helical domain. b, Views of the GLP-1R-Gs complex cryo-EM density map, coloured by subunit (transmembrane domains in light green, NTD in dark green, GLP-1 peptide in orange, G α s Ras-like in gold, G β in light blue, G γ in dark blue and Nb35 in grey). c, Structure of the activated GLP-1R-Gs complex in the same view and colour scheme as shown in b.

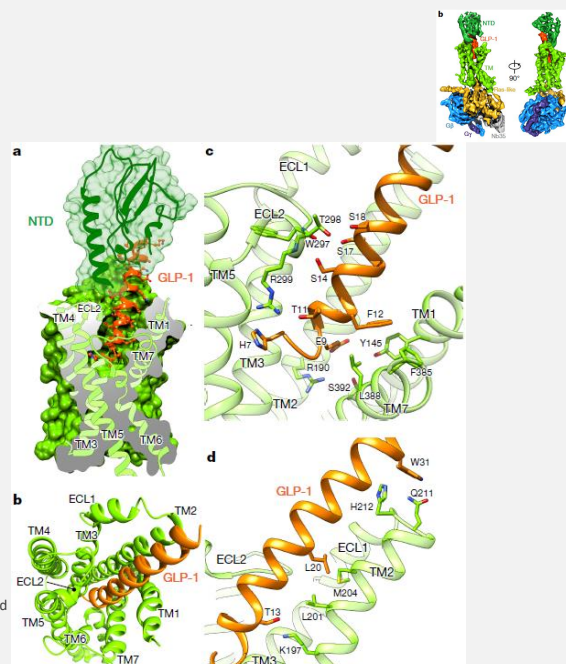
Rozpoznanie GLP-1 przez receptor The orthosteric peptide-binding pocket of GLP-1R

The activated GLP-1R structure shows that the GLP-1 peptide is stably anchored in its position through an extensive network of interactions that involves TM1, 2, 5, 7, ECL1 and 2, as well as the NTD.

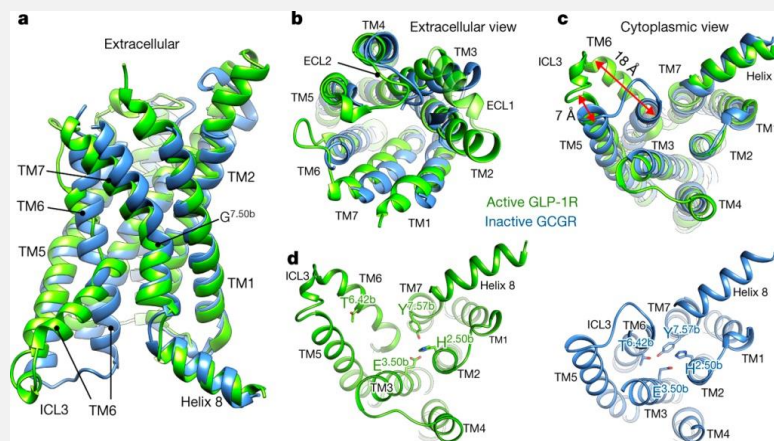
Even though the cryo-EM map is limited in resolution, the α -helical nature of the peptide and the stability of its position have allowed us to confidently establish its main interactions with the receptor.

The interface between the C-terminal half of the peptide hormone and NTD appears identical to the one in the crystal structure of NTD-GLP-1 (Extended Data Fig. 8). Notably, the cryo-EM map suggests that the NTD is not in contact with the 7TM region, although based on our refined structure we raise the possibility of Gln213 of ECL1 interacting with Arg40 located in the α 1-helix of the extracellular domain.

a, Cutaway view showing GLP-1 (ribbon and a tom in ball and stick, orange) penetration into a pocket formed by TM1, 2, 5, 7, ECL1 and ECL2 (ribbon and surface, light green) while its C-terminal part is recognized by the NTD (ribbon, light transparent surface, dark green). b, View from the extracellular side of the orthosteric peptide-binding pocket in the receptor bundle with omitted NTD. c, d, Close-up views of the interaction between the receptor and its endogenous agonist GLP-1.

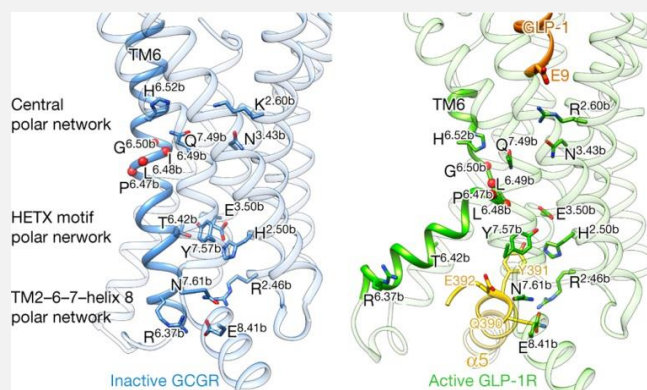


Comparison of active-state GLP-1R with inactive GCGR



a–c, Side (a), extracellular (b) and cytoplasmic (c) views of the activated GLP-1R transmembrane bundle (light green) in superposition to the inactive glucagon receptor bound to a allosteric antagonist (not shown; PDB code: 5EE7, blue). Significant conformational changes are observed on the cytoplasmic face of TM5 and TM6. TM6 moves outwards by 18 Å as measured at the C α of Lys 346, while TM5 moves a smaller distance by 7 Å when measured at the C α of Lys 334. A notable difference on the extracellular side is TM2 extended by three helical turns stabilized by peptide ligand binding. The disordered extracellular loops in the inactive GCGR structure are stabilized and structurally ordered in the activated GLP-1R structure. d, Comparison of HETX motif networking (in stick representation, Wootten numbering in superscript) between inactive GCGR and active GLP-1R shows that the outwards movement of TM6 removes T6.42b from the polar network.

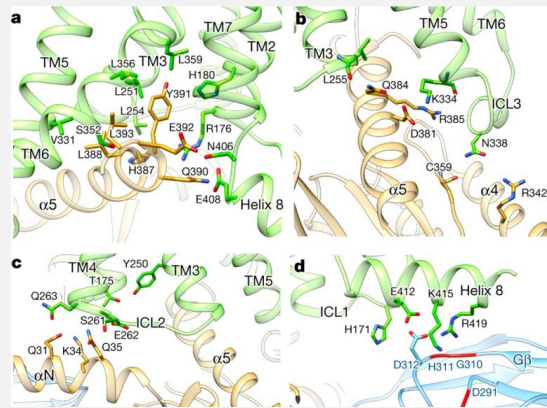
Polar network rearrangements upon GLP-1R activation



Comparison of polar network arrangements in the inactive-state GCGR (PDB code: 5EE7; the coordinates for residue R2.46b were obtained from the crystal structure of apo GCGR) and active-state GLP-1R. GLP-1 binding results in an outward movement of the cytoplasmic half of TM6 with simultaneous rearrangements of the central polar network. The rearrangement of TM6 breaks apart polar interactions of the conserved HETX and TM2–6–7–helix 8 networks, releasing residues for interactions with the α 5-helix of the Gas Ras-like domain. Peptide ligand GLP-1, TM6 and the α 5-helix of Gas Ras-like are shown in ribbon representation and coloured as in Fig. 1. Polar network residues are shown in stick representation with Wootten numbering in superscript. The exposed backbone carbonyl oxygen atoms of Pro6.47b–Leu–Leu–Gly6.50b are shown as red spheres.

GLP-1R interactions with G_s

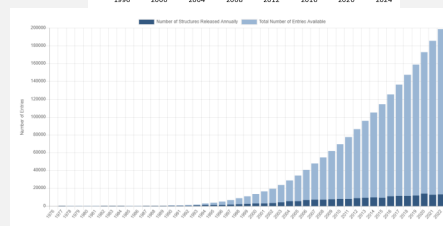
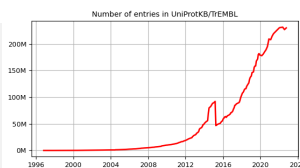
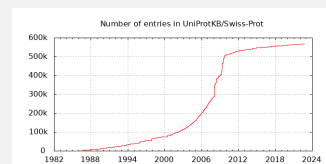
a, b, The $\alpha 5$ -helix of the Gas Ras-like domain docks into a cavity on the intracellular side of the receptor transmembrane bundle formed by the opening of transmembrane helices 5 and 6. a, G_s interactions with the transmembrane core include polar and non-polar contacts. The recognition of Y391 of the $\alpha 5$ -helix involves both a small hydrophobic pocket formed by L251, L356 and L359, and potential hydrogen bonding with H180 of the conserved polar network, equivalent to the E/DRY motif in class A GPCRs. b, Q384 and R385 of the $\alpha 5$ -helix form a polar interaction network with the cytoplasmic ends of TM3 and TM5, respectively. N338 of ICL3 is in close proximity to R342 of the $\alpha 4$ -helix and C359 of the $\beta 4$ -strand. c, Y250 of TM3 and T175 of TM2 form a hydrogen bond constraining the conformation of ICL1 and ICL2 with respect to each other. E262 and Q263 at the intracellular tip of TM4 and S261 of ICL2 form polar interactions with the stretch Q31-Q35 of αN -helix. d, H171 of ICL1 participates in the electrostatic interaction network between E412, K415 and R419 of helix 8 with D312 and D291 of G β (see also Extended Data Fig. 6b).



„Dziura” strukturalna

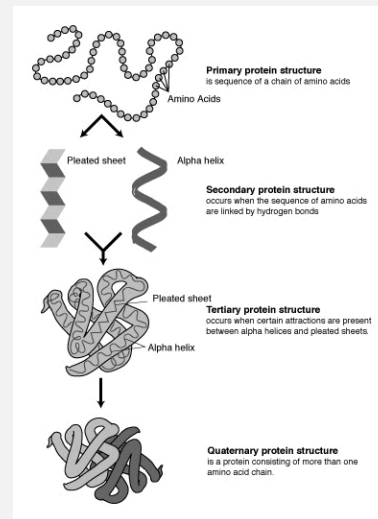
- Struktura to niezbędny element zrozumienia funkcji na poziomie molekularnym.

- Swiss-Prot około 600 tys sekwencji
- TrEMBL około 200 mln sekwencji
- PDB około 200 tys struktur



Przewidywanie struktury

- Pełna struktura
- Wybrane elementy strukturalne, np. struktura drugorzędowa



Ab initio

- *Ab initio* lub *de novo* przewidywanie struktury od zera, bez wykorzystania dostępnej wiedzy na temat budowy białek homologicznych.

Opiera się o parametry fizyczne elementów budujących białka (aminokwasów).

Procedura wykorzystuje przede wszystkim różnorakie metody minimalizacji energii.

Modele homologiczne

- Model struktury tworzony jest w oparciu o dostępne informacje (struktury) homologicznych białek.

I. Identyfikacja szablonów

- **25%** zgodności w dopasowaniu **80** lub **więcej** aminokwasów.

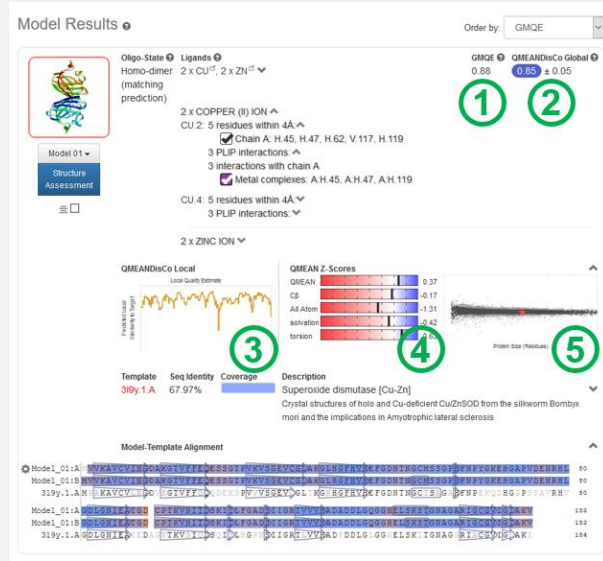
```
>THN_DENCL
KSCCFITTAARNQYNICRLPGTFRFVCAALSGCKIISGTGCPGGRH-
>1crnA
TTCCPSIVARSNFNVCRLPGTPEALCATYTGCIIPGATCPGDYAN-
```

Target	MAVHQIGEGGLVMYVTFG--LMAFSAFAVMTFTRPLNKRSHGYITLA	48
3am6.1.A	-----ETGMIAQWIVFAIM-- Q AAIAPQVAVHFRPSELHS-AYVINI	46
Target	IVTIAAIAYAMAASGGKALVSNPDGNLRDIYARYIDWFFTFELLLDI	98
3am6.1.A	AICTHIAATAYYAMAVNYQDLQNGE---RQVYARYIDWVITPELLELDL	98

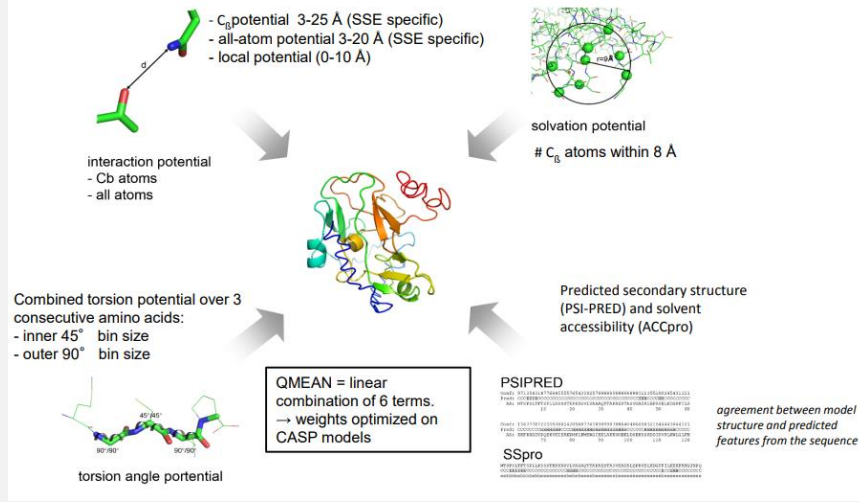
Sequence Identity: 33.80

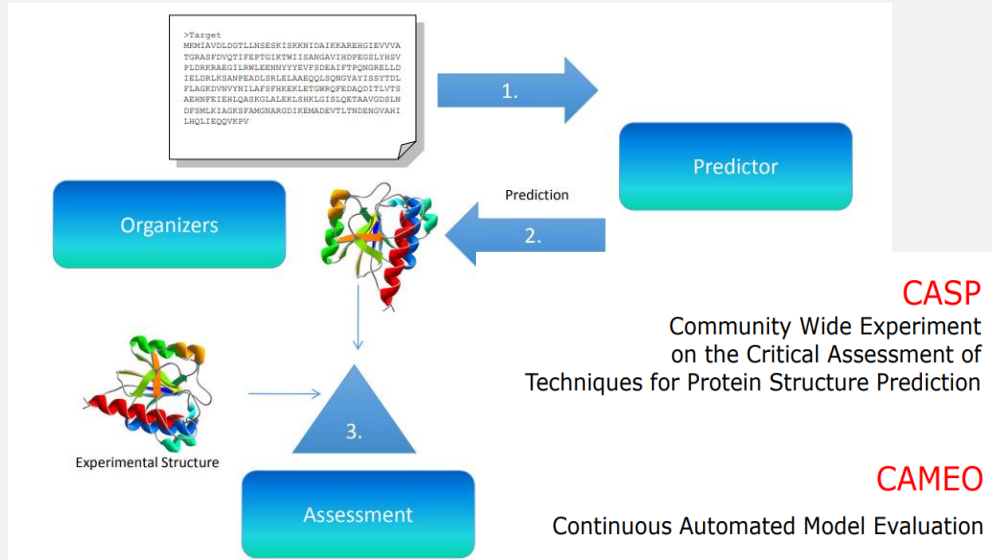
IV. Ocena wyników

- GMQE (Global Model Quality Estimate) is a quality estimate which combines properties from the target-template alignment and the template structure. They are combined using a multilayer perceptron trained to predict the IDDT score of the resulting model. The GMQE is available before building an actual model and thus helpful in selecting optimal templates for the modelling problem at hand. Once a model is built, the GMQE ((1) in the figure above) gets updated for this specific case by also taking into account the QMEANDisCo global score of the obtained model in order to increase reliability of the quality estimation.
- QMEANDisCo global score (Studer et al., (2) in the figure above) is the average per-residue QMEANDisCo score (see below) which has been found to correlate well with the IDDT score (Mariani et al.). The provided error estimate is based on QMEANDisCo global scores estimated for a large set of models and represents the root mean squared difference (i.e. standard deviation) between QMEANDisCo global score and IDDT (the ground truth). As the reliability of the prediction depends on model size, the provided error estimate is calculated based on models of similar size to the input.
- QMEAN Z-score analysis (Benkert et al.) is deprecated and the GMQE and QMEANDisCo global scores should be consulted for global model quality estimates instead. It is based on 4 statistical potentials of mean force and their linear combination: the "QMEAN" score. All scores, 5 in total, are compared with what one would expect from experimentally determined structures of similar size using Z-scores ((4) in the figure above). In other words: How many standard deviations from the mean is my model score given a score distribution from a large set of experimentally determined structures. Z-scores around 0.0 therefore reflect a "naïve-like" structure and, as a rule of thumb, a "QMEAN" Z-score below -4.0 indicates a model with low quality. This is illustrated by the "Comparison" plot ((5) in the figure above). The x-axis shows protein length (number of residues). The y-axis is the "QMEAN" Z-score. Every dot represents one experimental protein structure. Black dots are experimental structures with a "QMEAN" Z-score within 1 standard deviation of the mean (Z-score between 0 and 1), experimental structures with a Z-score between 1 and 2 are grey, Experimental structure that are even further from the mean are light grey. The actual model is represented as a red star.







QMEAN composite scoring function





Single-sequence protein structure prediction using a language model and deep learning

Ratul Chowdhury^{1,8}, Nazim Bouatta^{1,8} , Surojit Biswas^{2,3,8}, Christina Floristean^{4,8}, Anant Kharkar⁴, Koushik Roy⁴, Charlotte Rochereau⁵, Gustaf Ahdritz⁶ , Joanna Zhang⁴, George M. Church^{1,2}, Peter K. Sorger^{1,7}  and Mohammed AlQuraishi^{4,6} 

AlphaFold2 and related computational systems predict protein structure using deep learning and co-evolutionary relationships encoded in multiple sequence alignments (MSAs). Despite high prediction accuracy achieved by these systems, challenges remain in (1) prediction of orphan and rapidly evolving proteins for which an MSA cannot be generated; (2) rapid exploration of designed structures; and (3) understanding the rules governing spontaneous polypeptide folding in solution. Here we report development of an end-to-end differentiable recurrent geometric network (RGN) that uses a protein language model (AminoBERT) to learn latent structural information from unaligned proteins. A linked geometric module compactly represents C_{α} backbone geometry in a translationally and rotationally invariant way. On average, RGN2 outperforms AlphaFold2 and RoseTTAFold on orphan proteins and classes of designed proteins while achieving up to a 10^4 -fold reduction in compute time. These findings demonstrate the practical and theoretical strengths of protein language models relative to MSAs in structure prediction.

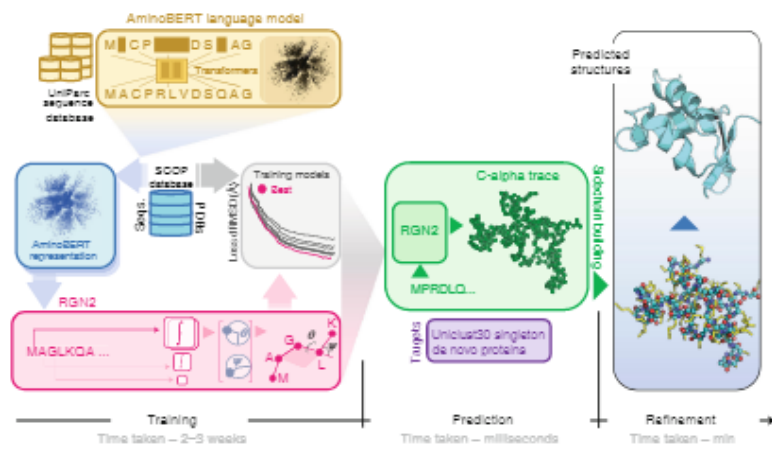


Fig. 1 | Organization and application of RGN2. RGN2 combines a transformer-based protein language model (AminoBERT, yellow) with an RGN that uses Frenet-Serret frames to generate the backbone structure of a protein (green). After initial construction of the sidechains and hydrogen-bonded networks, refinement of the structure is subsequently performed using AF2Rank (blue).