

Biotechnologiczne metody produkcji leków

Andrzej Łyskowski, dr inż.

andrzej.lyskowski@prz.edu.pl
H-237

Biotechnologia

Biotechnologia

› [gr. *bíos* 'życie', *téchnē* 'sztuka', 'rzemiosło', *lógos* 'słowo', 'nauka'], interdyscyplinarna dziedzina nauki posługująca się wiedzą z biochemii, mikrobiologii i nauk inżynierskich, obejmująca różne kierunki techniczne wykorzystania materiałów i procesów biologicznych (w szczególności obejmuje procesy biosyntezy i biotransformacji przebiegające z udziałem drobnoustrojów, kultur tkankowych — roślinnych i zwierzęcych — *in vitro* oraz enzymów, a także izolację otrzymanych w ten sposób bioproduktów).

Zastosowanie i kierunki rozwoju

Kluczowym celem jest:

- › Poszukiwanie nowych środków leczniczych
- › Szczepionek
- › Środków diagnostycznych

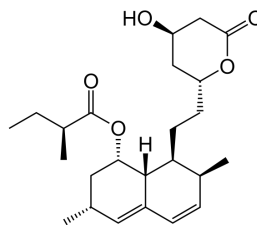
Kierunki rozwoju:

- › Techniki fermentacyjne
 - › Otrzymywanie antybiotyków
 - › Kwasów owocowych i wysokowartościowych produktów naturalnych
 - › Dodatków do środków spożywczych
- › Techniki kultur komórkowych:
 - › Otrzymywanie rekombinowanych białek
 - › Kultury startowe
- › Produkcja enzymów
- › Oczyszczanie ścieków
- › Kultury startowe w przemyśle spożywczym

Znaczenie rynkowe

Statyny

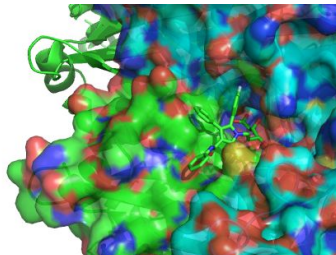
- › Inhibitory reduktazy HMG-CoA, grupa wielofunkcyjnych organicznych związków chemicznych, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych, o różnej budowie chemicznej, mających w formie aktywnej wspólną grupę farmakoforową: łańcuch β -hydroksykwasu.



Lovastatin, a compound isolated from Aspergillus terreus, was the first statin to be marketed.

Atrowastatyna

- › Syntetyczna pochodna
- › W 2003 najlepiej sprzedające się lekarstwo w historii
- › 12.4 mld USD sprzedaż firmy Pfizer w USA



Produkty lecznicze

Istotą biotechnologii farmaceutycznej jest projektowanie i produkcja nowych leków.

Podstawą tego procesu jest:

- › Wykorzystanie wiedzy o sposobach działania tych substancji na poziomie molekularnym

W projektowaniu należy uwzględnić:

- › Farmakodynamikę
Nowy środek leczniczy musi działać silnie i selektywnie.
- › Farmakokinetykę
Nowy środek musi mieć określoną, bezpieczną dla użytkownika, drogę od momentu podania, poprzez modyfikacje trawienne, do celu i w końcu wydalenia.

Zakres wiedzy

Proces projektowanie leków wymaga:

- › Znajomości i zrozumienia syntezy organicznej
- › Posiadania wiedzy na temat modelowania molekularnego
- › Biochemia
- › Farmakologii

Od zera do milionera

Faza 1

- › Odkrycie substancji aktywnej

Faza 2

- › Projektowanie analogów

Faza 3

- › Testowanie i doskonalenie leku

Pomiędzy powyższymi fazami konieczne jest:

- › Określenie strategii produkcji nowo odkrytej substancji

Enzymologia

enzym + gr. logos = nauka

Interdyscyplinarna nauka o enzymach, ich strukturze, mechanizmach działania, systematyce i praktycznym zastosowaniu. Rozwój enzymologii zapoczątkowały w XIX w. badania nad katalityczną aktywnością materiałów biologicznych i wyciągów z nich, wywodzące się z obserwacji trawienia i fermentacji (XVIII w.); termin enzym wprowadził 1877 W.F. Kühne.

enzymologia porównawcza ustala podobieństwa i różnice między określonymi enzymami u różnych gatunków organizmów, dążąc m.in. do poznania ewolucji enzymów;

enzymologia strukturalna bada strukturalne aspekty aktywności enzymatycznej; enzymologia fizyczna analizuje kinetyczne i termodynamiczne aspekty katalizy enzymatycznej;

...

Maszyneria komórkowa

enzymy [gr. en zýmē 'w zaczynie'], biokatalizatory, dawniej fermenty, białkowe katalizatory reakcji chemicznych w układach biologicznych.

- silnie zróżnicowaną pod względem budowy przestrzennej grupą białek;
- białka proste vs. białka złożone
holoenzym składającymi się z białkowego apoenzymu aktywnego katalitycznie dopiero po przyłączeniu drobnocząsteczkowego kofaktora;
- białka monomeryczne vs. białka oligomeryczne
zespół protomerów zbudowanych z oddzielnych łańcuchów polipeptydowych połączonych wiązaniami niekowalencyjnymi;
- enzymy są zbudowane
 - z co najmniej 100 reszt aminokwasowych,
 - mają masę cząsteczkową powyżej 10 kDa
 - średnicę od 2,5 nm.

Budowa enzymów

Łańcuch polipeptydowy o zdeterminowanej genetycznie sekwencji aminokwasów ulega sfałdowaniu, przybierając unikatową strukturę drugo- i trzeciorzędową; uporządkowana i charakterystyczna dla danego enzymu budowa przestrzenna (konformacja) określa rodzaj katalizowanej reakcji chemicznej oraz jej regulację.

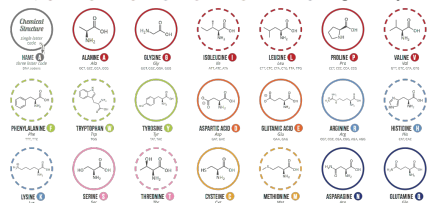
Budowa hierarchiczna:

- Struktura pierwszorzędowa;
- Struktura drugorzędowa;
- Struktura trzeciorzędowa;
- Struktura czwartorzędowa;

A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 200 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE. HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY PRODUCES 20. THUS, AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET. WHILE NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESIZED IN THE BODY,

Chart Key: ● ALIPHATIC ● AROMATIC ● ACIDIC ● BASIC ● HYDROPHILIC ● SULFUR-CONTAINING ● AMIDES ● NON-ESSENTIAL ● ESSENTIAL

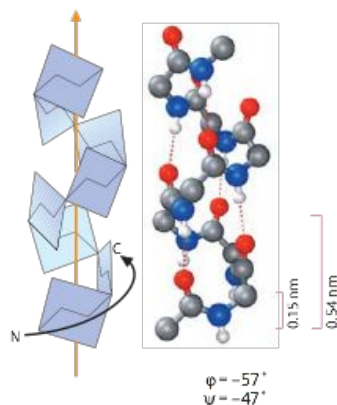


© 2015 BY THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY. ALL RIGHTS RESERVED. FOR MORE INFORMATION, VISIT www.chemeddl.org.
 2015-01-01 14:00:00 UTC. 100% COPYLEFT. 100% BY THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY. 100% BY THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY.

α helisa

Ma charakter dipolowy, tzn. niepolarny rdzeń otaczają polarne grupy boczne ułożeniu heliakalnie po zewnętrznej stronie.

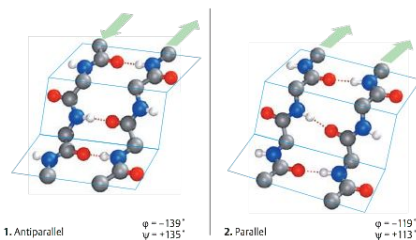
- W białkach występują głównie helisy prawoskrętne.
- Struktura ta stabilizowana jest wiązaniami wodorowymi powstającymi między grupą CO aminokwasu, a grupą NH aminokwasu oddalonego o cztery reszty aminokwasowe.
- Na jeden obrót helisy przypada 3,6 reszt aminokwasowych, natomiast skok helisy wynosi 0,54 nm.
- Każda reszta aminokwasowa jest przesunięta w stosunku do sąsiedniej o 0,15 nm wzdłuż osi helisy i obrócona o 100° wokół osi;



β harmonijka

β -harmonijka (β -karta) – przyjmuje rozciągnięty kształt.

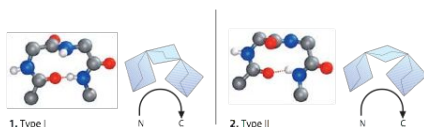
- Odległość pomiędzy sąsiadującymi aminokwasami wynosi 0,35 nm.
- Struktura ta stabilizowana jest wiązaniami wodorowymi tworzącymi się pomiędzy grupami CO i NH aminokwasów leżących w jednej płaszczyźnie.
- Może być ona utworzona przez kilka łańcuchów polipeptydowych ułożonych w jednym kierunku (równoległa β -harmonijka) lub w kierunku przeciwnym (antyrownoległa β -harmonijka).



Struktury n -rzędowe

Z uwagi na właściwości hydrofobowe łańcuchów bocznych, struktury α -helisy i β -harmonijki mogą oddziaływać między sobą tworząc złożone motywy. Pełnią one kluczową rolę podczas fałdowania się białka.

- „szpilka do włosów” (ang. harpin loop) składa się z antyrównoległej struktury β podtrzymywanej przez pojedynczy łańcuch polipeptydowy. Odwrócenie łańcucha tworzy się dzięki wiązanom wodorowym pomiędzy grupą CO reszty n aminokwasu, a grupą NH reszty $n+3$ aminokwasu;
- „klucz grecki” – rozbudowany motyw „szpilki do włosów”, w którym jeden łańcuch polipeptydowy tworzy cztery antyrównoległe struktury β -harmonijki;
- „heliks-pętla-heliks” (ang. helix-turn-helix) ten motyw α -helisy występuje głównie w białkach wiążących DNA;
- „suwaki leucytowe” – składają się z dwóch splecionych ze sobą i bogatych w leucynę α -helis. Dzięki zasadowemu charakterowi struktura ta ma duże powinowactwo do DNA;
- $\beta\alpha\beta$ to rodzaj motywu mieszanego, w którym α -helisa usytuowana jest pomiędzy dwoma równoległe ułożonymi łańcuchami β -harmonijki, w taki sposób, że hydrofobowe strony obu łańcuchów kontaktują się ze sobą.



Funkcje enzymów

Enzyme	Nonenzymatic $t_{1/2}$ ¹	Turnover number ²	Rate enhancement ³
OMP decarboxylase	78,000,000 yr	39	1.4×10^{12}
Staphylococcal nuclease	130,000 yr	95	5.6×10^{12}
Adenosine deaminase	120 yr	370	2.1×10^{12}
AMP nucleosidase	69,000 yr	60	6.0×10^{12}
Cytidine deaminase	69 yr	299	1.2×10^{12}
Phosphotriesterase	2.9 yr	2,100	2.8×10^{12}
Carboxypeptidase A	7.3 yr	578	1.9×10^{12}
Ketosteroid isomerase	7 wk	66,000	3.9×10^{12}
Triosephosphate isomerase	1.9 d	4,300	1.0×10^{12}
Chromate mutase	7.4 hr	50	1.9×10^6
Carbonic anhydrase	5 sec	1×10^7	7.7×10^6
Cyclophilin, human	23 sec	13,000	4.6×10^6

Obrót enzymu (ang. turnover number):
liczba reakcji katalizowanych przez jedną cząsteczkę enzymu na sekundę.

Wzrost szybkości reakcji (ang. rate enhancement).

• Funkcje katalityczne

Idea działania enzymów zakłada, że wykorzystują one wszystkie chemiczne siły i oddziaływania aby substrat(y) znalazły się w optymalnym położeniu i możliwe było tworzenie lub rozrywanie wiązań chemicznych.

Odbyna się to poprzez stabilizację wysoce energetycznego stanu przejściowego

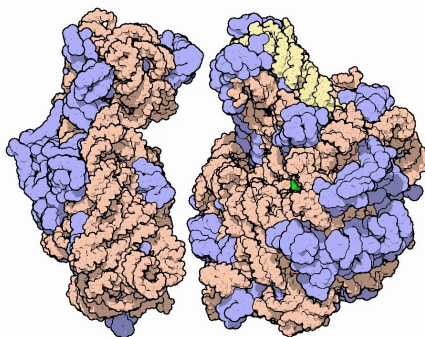
- enzymem jest cząsteczka zdolna do przeprowadzania katalizy reakcji chemicznej;
- enzymy są w stanie przeprowadzać ogromnie różnorodne reakcje chemiczne, ponieważ potencjalnie są w stanie wiązać bardzo szerokie spektrum cząsteczek chemicznych;
- kataliza zachodzi w części enzymu nazywanej centrum katalitycznym;
- enzymy przyspieszają reakcje chemiczne nawet 1000 razy;
- najistotniejsze cechy enzymów to moc katalityczna oraz specyficzność (swoistość);

Rybozomy

Nie tylko białka są zdolne do katalizowania reakcji biochemicznych – kilka cząsteczek RNA również ma zdolność do przeprowadzania reakcji, nazywamy je rybozymami.

Większość enzymów jest globularnymi białkami, jednak istnieje liczna grupa cząsteczek RNA o zdolnościach katalitycznych, które nazywamy rybozymami (uważa się, że rybozomy są ewolucyjnie starsze od enzymów białkowych).

Reakcje te prowadzone są z udziałem białek, ale białka pełnią tam rolę strukturalną, za samą katalizę odpowiada RNA.

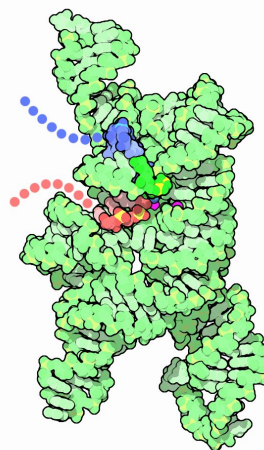


Struktura rybosomu.
RNA przedstawiono w kolorze pomarańczowym i żółtym,
białko w kolorze niebieskim.

Splicing mRNA

W trakcie splicingu introny I klasy same wycinają się z pre-mRNA, tworząc dojrzałe mRNA, reakcja przebiega autokatalitycznie

Odkrycie rybozymów wyjaśniło odwieczną zagadkę co było pierwsze: jajko (DNA) czy kura (białko). Skoro białka (enzymy) potrzebne są do replikacji DNA, transkrypcji i translacji a do powstania białka niezbędny jest kod w postaci DNA, to co powstało pierwsze. Okazało się, że RNA – samo było informacją genetyczną i jednocześnie mogło przeprowadzać reakcje. Z czasem funkcję nośnika informacji przejęło stabilniejsze DNA natomiast funkcje katalityczne – białka. W ewolucji etap przed pojawianiem się DNA i białek nazywany jest światem RNA.

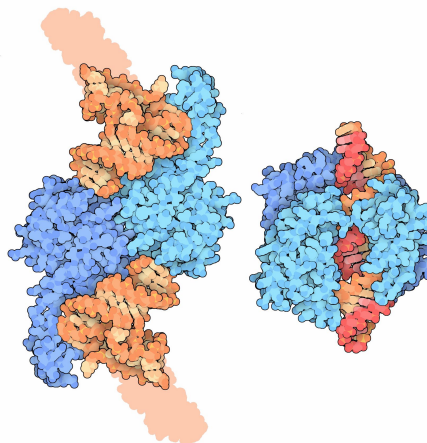


Rybonukleaza A

Jest enzymem odpowiedzialnym za trawienie RNA w pokarmie.

Ze względu za wyjątkową stabilność, łatwość w oczyszczaniu jest wykorzystywana w biotechnologii i badaniach biochemicznych.

Jest endonukleazą, tzn. że w przeciwieństwie do innych nukleaz posiada zdolność degradacji RNA od środka łańcucha a nie od jego końców.



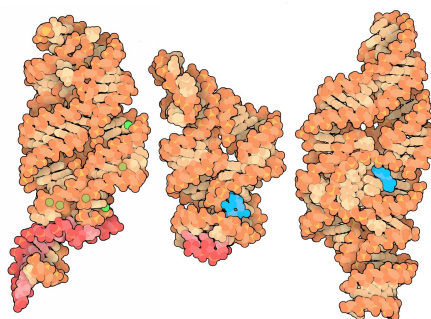
Rybonukleaza Z (PDB-ID: 2FK6) związana z fragmentem tRNA (na lewo)
Rybonukleaza III (PDB-ID: 2EZ6) związana z dwuniciowym RNA (na prawo)

Ryboprzełącznik

Ryboprzełącznik lub przełącznik RNA łańcuch kwasu rybonukleinowego mRNA który reguluje ekspresję kodowanego przez siebie białka.

Ryboprzełączniki uczestniczą w regulacji metabolizmu tych organizmów - wpływają na intensywność syntezy wielu związków organicznych takich jak np: zasady azotowe budujące kwasy nukleinowe czy kobalamina. Istnieje także ryboprzełącznik mogący wiązać się z kationami magnezu, przez co ma on wpływ na regulacji gospodarki tego mikroelementu.

U człowieka zidentyfikowano dotychczas jeden przełącznik RNA, wiążący 2-aminopurynę. Pełni on jednak dość istotną rolę, ponieważ reguluje ekspresję TNF- α , który pełni ważną rolę podczas zakażeń wirusowych i transformacji nowotworowej.

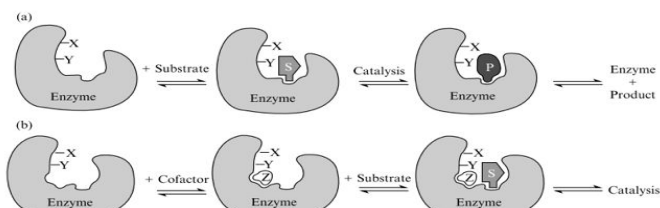


Domeny ryboprzełączników związane z jonami magnezu (na lewo)
z nukleotydem c-di-GMP (centrum)
z 6-fosforanem-glukozaminy (na prawo)

Miejsce aktywne

Wszystkie enzymy (, którymi będziemy się szczegółowo zajmować) są białkami, ale nie wszystkie białka są enzymami.

Część n-rzędowej struktury białka odpowiedzialna za aktywność katalityczną nazywa się „miejscem aktywnym” i najczęściej zajmuje 10-20% całej objętości białka.



Wiązanie ligandów w miejscu aktywnym

Charakter miejsca aktywnego jest ściśle związany z katalizowaną reakcją chemiczną - parametrami fizykochemicznymi ligandów.

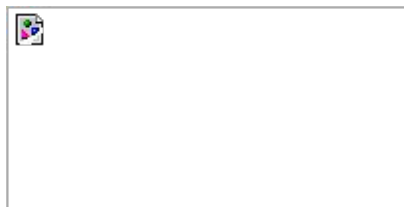
Ligandem nazywamy substrat lub produkt reakcji chemicznej katalizowanej przez enzym.

Jedną z podstawowych cech enzymów jest wysoka specyficzność substratowa, która wynika z serii wysoce specyficznych niekowalencyjnych interakcji łączących enzym i substrat.

Centra aktywne są chiralne, więc naturalna jest wyższa zdolność wiązania jednego enancjomeru nad drugim (jak dłoń i rękawiczka).

Wyróżnia się 4 podstawowe typy interakcji enzym-substrat wykorzystywane przez enzymy:

- interakcje elektrostatyczne;
- wiązania wodorowe;
- interakcje hydrofobowe;
- interakcje niepolarne (Van der Waalsa);



Centrum aktywne | Oddziaływania elektrostatyczne

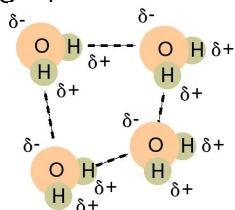
Interakcje elektrostatyczne dotyczą substratów posiadających zjonizowane grupy funkcyjne reagujących z przeciwnie naładowanymi resztami aminokwasów w miejscu aktywnym, np. kwasy karboksylowe w pH7 występują jako ujemnie naładowane jony karboksylowe i wiążą się często z dodatnio naładowanymi grupami lizyny (grupa ϵ -aminowa) lub argininy (gr. guanidynowa). Z kolei ujemnie naładowane substratu wiążą się z ujemnie naładowanymi bocznymi łańcuchami asparagianu i glutaminianu



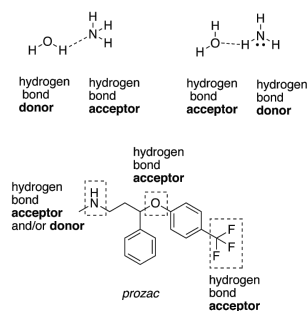
Schemat oddziaływań w centrum aktywnym aminotransferazy.
PDB-ID: 1A3G.

Centrum aktywne | Wiązania wodorowe

Wiązania wodorowe tworzą się pomiędzy donorem wiązania zawierającym wolną parę elektronów i akceptorem zawierającym kwasowy atom wodoru. W ten sposób najczęściej wiązane są substraty polarne. Siła wiązania zależy od natury chemicznej i ułożenia przestrzennego reagujących grup.



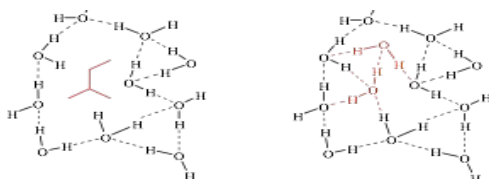
Wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody.



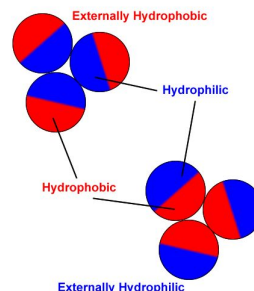
Inne wiązania wodorowe występujące w białku

Centrum aktywne | Interakcje hydrofobowe

Hydrofobowe substancje mają tendencję do agregacji i ekstrakcji z roztworów wodnych, dlatego też hydrofobowe substraty (lub zawierające hydrofobowe grupy czy powierzchnie) wiążą się preferencyjnie z hydrofobowymi fragmentami miejsca aktywnego.



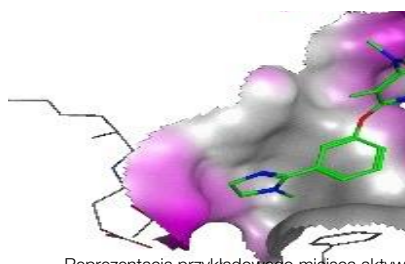
Oddziaływania hydrofobowe w obecności ligandu (po lewej) i bez (po prawej).



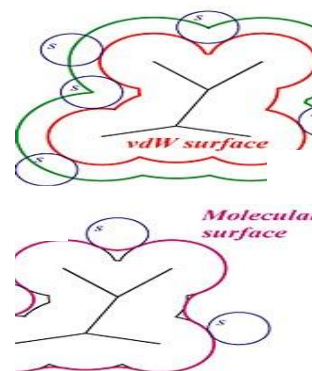
Geneza oddziaływań hydrofobowych.

Centrum aktywne | Interakcje niepolarne (Van der Waalsa)

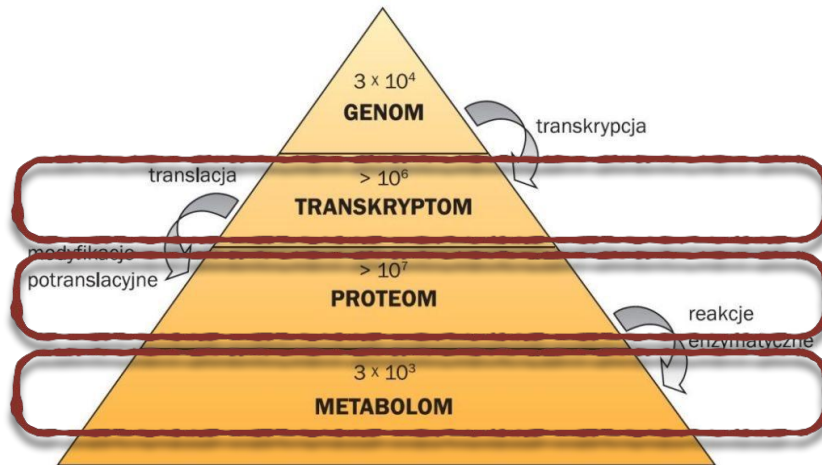
Wynikają z bliskości atomów substratu i miejsca aktywnego. Zazwyczaj kształt miejsca aktywnego jest wysoce komplementarny do kształtu substratu stąd siły te sumują się i dają trwałe wiązanie



Reprezentacja przykładowego miejsca aktywnego.



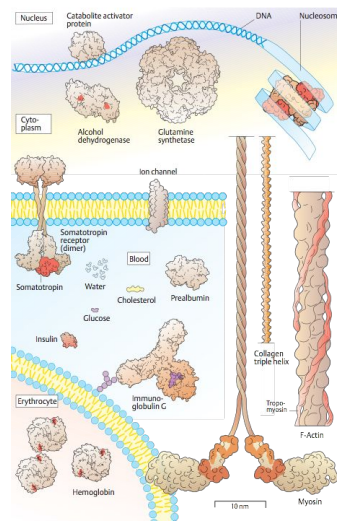
Wyznaczanie zakresu oddziaływań niepolarnych



Peptydy i białka

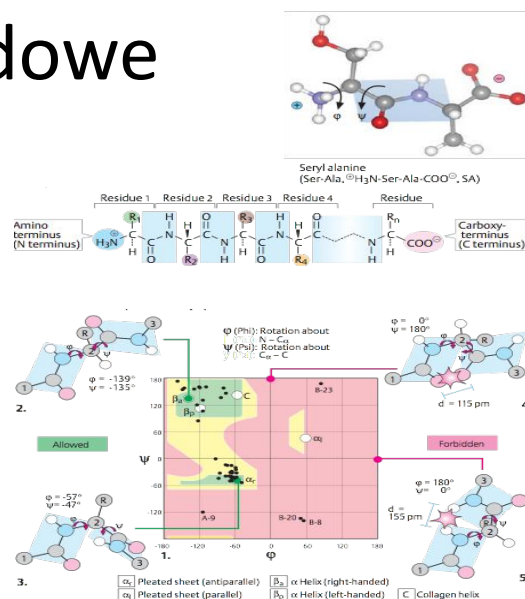
• Powszechność występowania:

- tworzenie i podtrzymywanie struktur komórkowych
 - kolagen
 - histony
- transport
 - hemoglobina
 - prealbumina
 - kanały jonowe
- ochrona i obrona
 - immunoglobuliny
- kontrola i regulacja
 - hormony i ich receptory
 - insulina
- kataliza
 - dehydrogenaza alkoholowa
- ruch
- przechowywanie



Wiązanie peptydowe

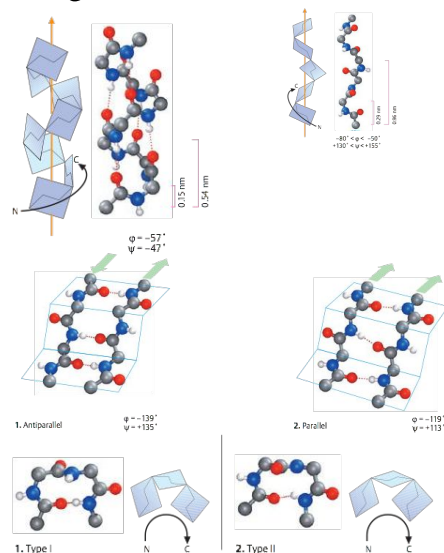
- Podstawowym wiązaniem definiującym strukturę pierwszorzędową białek jest wiązanie peptydowe
- Sekwencja białek jest definiowana od końca N- (NH_3) do końca C- (COO^-)
- Wykres Ramachandran'a obrazuje dopuszczalne wartości kątów Phi i Psi pomiędzy atomami N-C α i C α -C



Struktura drugorzędowa

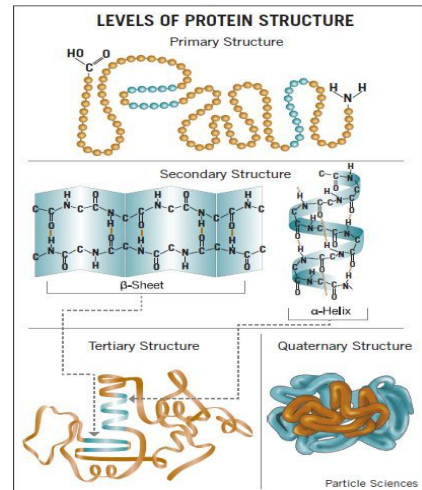
- Specyficzne układy kątów phi-psi prowadzą do powstania elementów struktury drugorzędowej

- α -helisa
- β -harmonijka
- zwroty/pętle β



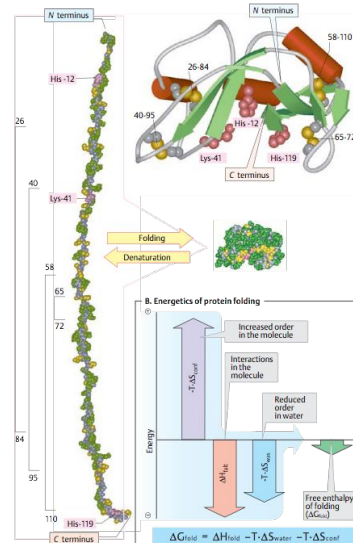
Struktury n-rzędowe

- Pierwszorzędowa
- Drugorzędowa
- Trzeciorzędowa
 - wzajemne ułożenie elementów drugorzędowych
- Czwartorzędowa
 - wzajemne ułożenie elementów trzeciorzędowych



Fałdowanie białek

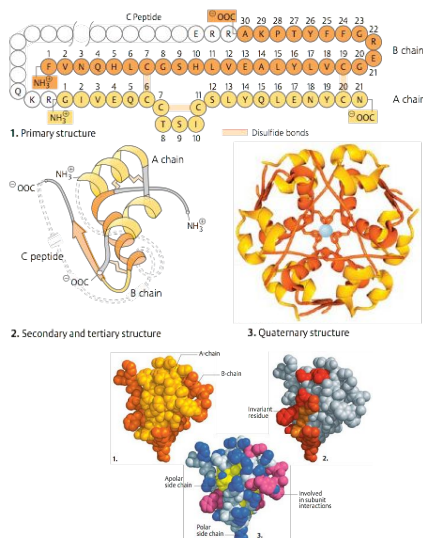
- Funkcjonalna forma białek to struktura 3D
 - poprawne fałdowanie prowadzi do powstania miejsca aktywnego
- Fałdowanie to proces wieloetapowy. Jego siłą napędową jest między innymi:
 - wzrost uporządkowania cząsteczki
 - wewnętrzne oddziaływania $\rightarrow$ powstawanie elementów drugorzędowych
 - usunięcie wody z wnętrza białka
 - redukcja entalpii
- Stabilizacja białek w formie aktywnej jest jednym z celów działania środków leczniczych





Białka ulegają przemianom

- Insulina
 - 1922 odkrycie
 - 1923 Eli Lilly, USA wprowadza pierwszą insulinę do obrotu
 - 1923 Nordisk Insulinlaboratorium, Dania rozpoczyna produkcję insuliny z trzustki wołowej
- Przemiany 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;
 - nitryzacja;
 - lipidyzacja;
 - SUMOilacja;

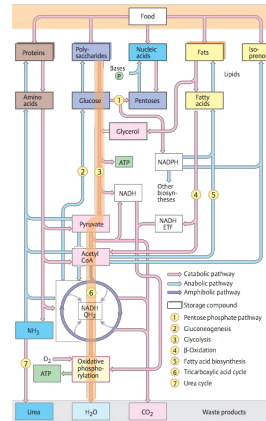


Enzymy

- Białka odpowiadające za aktywność biochemiczną
- Miejsce aktywne są centrum reakcji
- Mechanizm katalizy opiera się o specyficzne właściwości reszt kwasów budujących białka
- Enzymy można blokować poprzez zastosowanie inhibitorów
- Leki mogą wykorzystywać specyficzność substratową enzymów w celach terapeutycznych

Metabolizm

- **Metabolizm**
 - całokształt reakcji chemicznych i związanych z nimi przemian energii zachodzących w żywych komórkach, stanowiący podstawę wszelkich zjawisk biologicznych. Procesy te pozwalają komórce na wzrost i rozmnażanie, zarządzanie swoją strukturą wewnętrzną oraz odpowiadanie na bodźce zewnętrzne
- **Katabolizm**
 - ogół reakcji chemicznych metabolizmu prowadzący do rozpadu złożonych związków chemicznych na prostsze cząsteczki
- **Anabolizm**
 - grupa reakcji chemicznych, w wyniku których z prostych substratów powstają związki złożone, gromadzące energię.



Enzymy

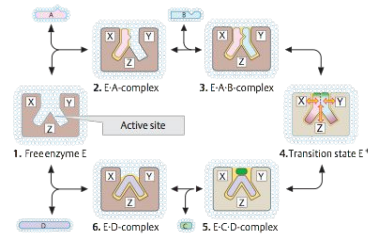
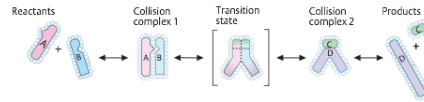
- **Numer EC**
 - numer przypisany każdemu enzymowi według zasad klasyfikacji opracowanej w 1984 roku przez Komitet Nazewnictwa (ang. Nomenclature Committee) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. International Union of Biochemistry).
 - Numery EC Enzyme Commission (Komisja Enzymatyczna) lub Enzyme Catalogue dzielą wszystkie enzymy na sześć głównych grup ze względu na typ katalizowanej reakcji.
 - Komisja Enzymatyczna przypisała każdemu enzymowi zarekomendowaną nazwę i czteroczęściowy różniący numer o strukturze XX.XX.XX.XX

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$	C-Transferases Cyclotransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-OH + B$	Esterases Glycosidases Proteases Amidases
4 Lyases ("Fyntheses")	$A + B \rightleftharpoons A-B$	C-C Lyases C-O Lyases C-N Lyases C-S Lyases
5 Isomerases	$A \rightleftharpoons B$	Epimerases All other isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("Fyntheses")	$A + B + XTP \rightleftharpoons A-B + XDP$	C-C Ligases C-O Ligases C-N Ligases C-S Ligases

Kataliza

Reakcje chemiczne vs. reakcje katalizowane

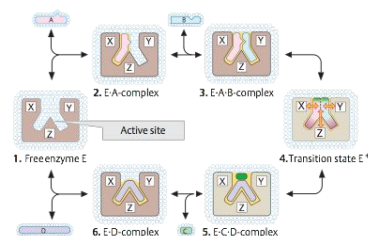
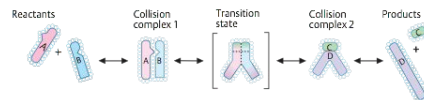
- kompleks A-B
 - $\alpha A + \beta B = \gamma C + \delta D$
substraty A i B znajdujące się w roztworze wodnym są otoczone cząsteczkami wody (powłoczka hydratacyjna). Poruszają się w różnych kierunkach cząsteczki te mogą przereagować tylko jeżeli zderzą się ze sobą w odpowiedniej orientacji – co następuje rzadko.
- substraty muszą spotkać się na drodze przypadku vs. miejsce aktywne promuje i koordynuje oddziaływania
- stan przejściowy
 - wymaga nakładów energii vs. konfiguracja miejsca aktywnego obniża wymagania energetyczne
- energia aktywacji
 - musi być dostarczona z zewnątrz vs. jest 'zmagazynowana' wewnątrz enzymu



Kataliza

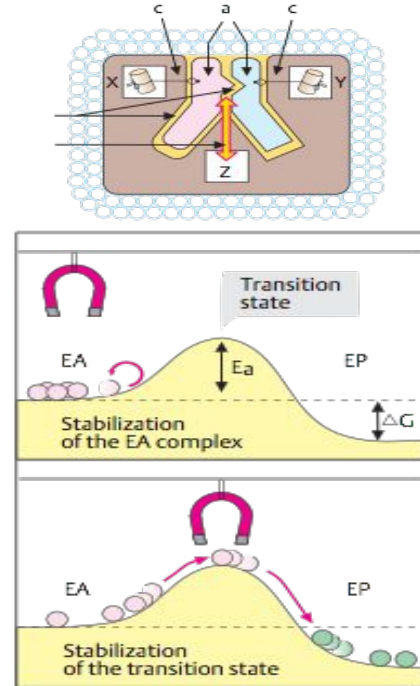
Reakcje chemiczne vs. reakcje katalizowane

- kompleks A-B
 - vs. miejsce aktywne promuje i koordynuje oddziaływania
- stan przejściowy
 - enzym wiąże substraty A i B w centrum aktywnym, powoduje to, że są one usytuowane w optymalnej orientacji do tworzenia stanu przejściowego (1-3).
 - bliskość i orientacja substratów powoduje znaczny wzrost prawdopodobieństwa stworzenia kompleksów A-B. Ponadto związanie substratów powoduje usunięcie ich otoczki hydratacyjnej, a przez to warunki zachodzenia reakcji są zupełnie inne niż w roztworze.
 - A to z kolei obniża energię aktywacji niezbędną do stworzenia kompleksów przejściowych
 - interakcja pomiędzy resztami aminokwasowymi budującymi centrum aktywne enzymu a substratami powoduje stabilizację stanu przejściowego (4)
- wymaga nakładów energii vs. konfiguracja miejsca aktywnego obniża wymagania energetyczne
- energia aktywacji
 - musi być dostarczona z zewnątrz vs. jest 'zmagazynowana' wewnątrz enzymu



Kataliza

- Przed konwersją w produkty C i D kompleks „kolizyjny” musi przejść przez stan przejściowy, stworzenie którego wymaga dużego nakładu energii aktywacji (E_a).
- Dlatego też stan przejściowy występuje jeszcze rzadziej niż stan „kolizyjny” – nie wszystkie kompleksy A-B są w stanie wyprodukować potrzebną energię.
- Zdecydowana większość tej energii potrzebna jest do usunięcia otoczki hydratacyjnej z cząsteczek substratów
- Z tych powodów spontaniczne reakcje są bardzo rzadkie nawet jeżeli są termodynamicznie możliwe.
- Zalety katalizy enzymatycznej:
 - zbliżenie i ustawienie substratów we właściwej orientacji,
 - usunięcie powłoki hydratacyjnej,
 - stabilizację stanu przejściowego,
 - kontrolowane przeniesienie grup funkcyjnych.

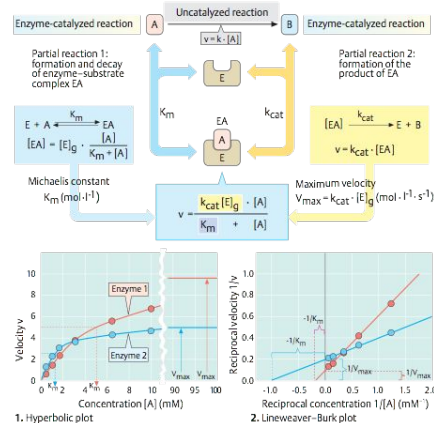


Kinetyka reakcji enzymatycznych

- Enzymy używają tych samych substratów jak miało by miejsce w reakcji niekatalizowanej.
- Enzymy nie zmieniają także stanu równowagi reakcji chemicznej, a jedynie przyspieszają jego ustalenie.
- Enzymy jednak potrafią się wysycić substratami. Oznacza to, że przy stałej ilości enzymu, a rosnącej substratów, prędkość reakcji będzie rosnąć, ponieważ wysycane są kolejne, jeszcze nie zajęte, miejsca aktywne enzymów.

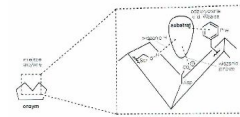
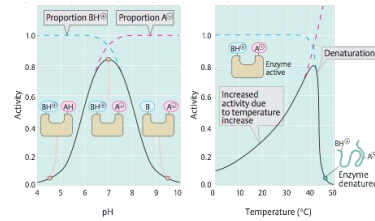
Stała Michaelisa (K_m)

- takie stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie szybkości maksymalnej (V_{max}) tej reakcji.
- Stała ta określa powinowactwo enzymu do substratu:
 - im jest mniejsza, tym powinowactwo jest większe, natomiast duża wartość tej stałej mówi o małym powinowactwie enzymu do substratu.



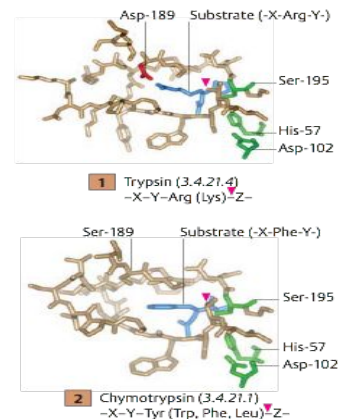
Kinetyka reakcji enzymatycznych

- Szybkość reakcji zależy od wielu czynników:
 - pH
 - temperatura
- Specyficzność substratowa
 - opiera się o zdolność rozpoznawania substratu w miejscu aktywnym



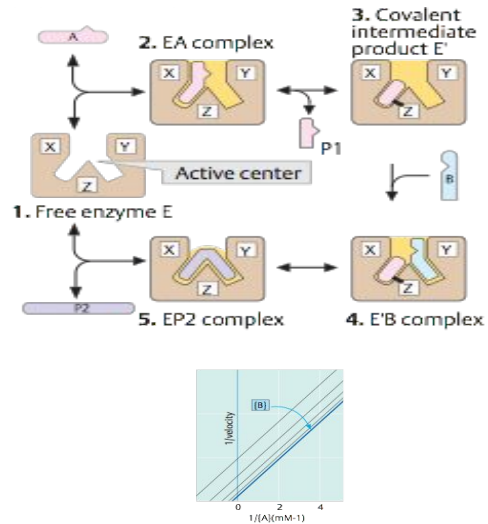
Kinetyka enzymów | specyficzność substratowa

- Enzymy rozpoznają swoje substraty z bardzo wysoką dokładnością, dzięki temu ich aktywność może być dokładnie regulowana.
- Przykład – dwie proteazy serynowe: trypsyna i chymotrypsyna. Obie zawierają charakterystyczną dla tej grupy enzymów triadę katalityczną – trzy aminokwasy (Asp-His-Ser) w centrum aktywnym odpowiedzialne za katalizowanie reakcji.
- Trypsyna przecina łańcuch AA po karboksylowej stronie aminokwasów zasadowych, chymotrypsyna po hydrofobowych
- Struktura kieszeni wiążącej substrat (S1) jest bardzo podobna w obu enzymach, jednak różnią się one aminokwasami znajdującymi się w jej wnętrzu: trypsyna ma negatywnie naładowaną resztę Asp-189, która może wiązać pozytywnie naładowane łańcuchy boczne substratu; chymotrypsyna ma węższą kieszeń, zawierającą obojętne i hydrofobowe reszty, które stabilizują niepolarne łańcuchy boczne substratu poprzez oddziaływania hydrofobowe.

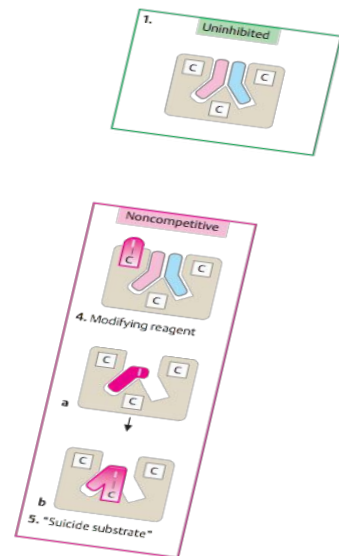
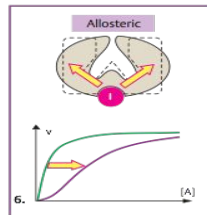
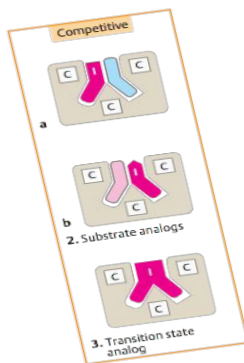


Kinetyka enzymów reakcje wielosubstratowe

- Większość enzymów w trakcie reakcji wykorzystuje więcej niż jeden substrat i produkuje więcej niż jeden produkt.
- Rzadko się także zdarza, że oba substraty wiązane są jednocześnie
- W reakcji z dwoma substratami:
 $A + B \rightarrow C + D$
 możliwe są różne sekwencje reakcji. Oprócz mechanizmu sekwencyjnego, w którym wszystkie substraty wiązane są w określonej kolejności zanim produkt zostanie uwolniony, istnieją także mechanizmy pozwalające na związanie pierwszego substratu (A) i jego rozcięcie. Jego odcięta część pozostaje związana z enzymem i jest przenoszona na drugi substrat (B), po czym zostaje uwolniony produkt C.
- Mechanizm taki nazywany jest ping-pong i wykorzystują go np. transaminazy
- Na wykresie Lineweavera-Burka przy zmiennym stężeniu A i różnych, stałych stężeniach B otrzymujemy szereg równoległych prostych



Inhibicja enzymów

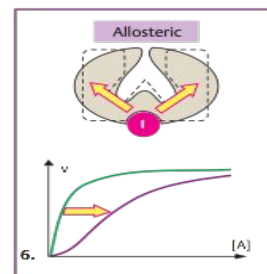
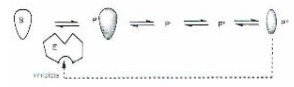


Inhibicja

- Biologiczne zahamowanie lub opóźnienie procesu enzymatycznego w organizmie.
- Podstawowe typy inhibicji:
 - allosteryczna
 - kompetycyjna
 - niekompetycyjna
- Szczególnym przypadkiem są inhibitory akompetycyjne, które obniżają zarówno $V_{\max}$ jak i K_m .
Ich działanie polega na wiązaniu się do kompleksu enzym-substrat.

Inhibicja allosteryczna

- allosteryczna
Obniżenie aktywności katalitycznej enzymu w wyniku zmiany jego konformacji spowodowanej przyłączeniem się inhibitora do innego miejsca niż miejsce aktywne. W związku z brakiem współzawodnictwa substratu i inhibitora o miejsce aktywne, zwiększenie stężenia substratu nie może przewyżżyć inhibicji. Inhibitor znacznie zmniejsza liczbę obrotów enzymu, nie ma wpływu na liczbę cząsteczek enzymu wiążących substrat. W przypadku inhibicji allosterycznej obserwuje się brak zmiany wartości stałej Michaelisa (gdyż miejsc wiążących na enzymie dostępnych dla substratu jest tyle samo), przy jednoczesnym pomniejszeniu wartości szybkości maksymalnej (z powodu działania inhibitora, zmniejszającego szybkość reakcji katalizowanej przez enzym).



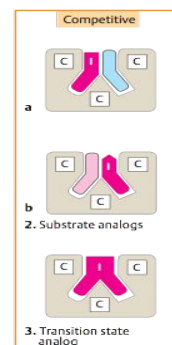
Inhibicja kompetycyjna

- kompetycyjne

Hamowanie kompetycyjne, inhibicja konkurencyjna – współzawodniczenie inhibitora z substratem o miejsce aktywne enzymu. Przy dużych stężeniach substratu inhibitor zostaje wyparty. Substrat i inhibitor konkurują o miejsce katalityczne (aktywne) w taki sposób, że zwiększenie stężenia jednego z nich powoduje przesunięcie szybkości reakcji na jego korzyść. Jeśli stężenie substratu będzie przewyższać stężenie inhibitora, to szybkość reakcji zmniejszy się nieznacznie albo w ogóle nie ulegnie zmianie. Jeśli przeważać będzie ilość inhibitora w roztworze, to katalizowana reakcja ulegnie zahamowaniu. W przypadku inhibicji kompetycyjnej powinowactwo enzymu do substratu się zmniejsza (stała Michaelisa rośnie).

Inhibicja kompetycyjna

- Wiąże się z bezpośrednim oddziaływaniem w obszarze miejsca aktywnego.
- Analogi substratów i analogi stanu przejściowego mają właściwości zbliżone do substratu, są wiązane przez enzym, ale nie zamieniane w produkt, przez co blokują miejsce aktywne, potrzebne jest zwiększenie stężenia substratu aby osiągnąć prędkość maksymalną więc K_m rośnie, natomiast sama wartość V_{max} się nie zmienia. Przez to że inhibitory te konkurują z substratem o miejsce aktywne, zwiększenie stężenia substratu pozwala na usunięcie inhibitora z centrum aktywnego



Inhibicja niekompetycyjna

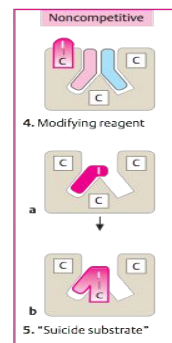
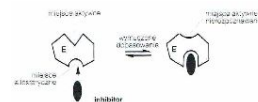
- niekompetycyjna

Inhibitor niekompetycyjny wiąże się w zupełnie innym miejscu enzymu niż centrum aktywne i centrum allosteryczne. Jeśli inhibitorem jest duża cząsteczka, zachodzi sytuacja, w której cząsteczka ta wiąże się do domeny białka zawierającej centrum aktywne. Wiązanie to nie wpływa na strukturę części enzymatycznej białka, ale zasłania wejście do centrum aktywnego, przez co enzym jest nieaktywny. W przypadku kiedy inhibitor przyłączy się tak, że będzie zasłaniał centrum tylko częściowo lub w ogóle, reakcja będzie zachodziła, jednakże wolniej.

Inhibitory niekompetycyjne nieodwracalne nie wykazują strukturalnego podobieństwa do substratu, zwiększenie stężenia substratu na ogół nie zmniejsza hamowania.

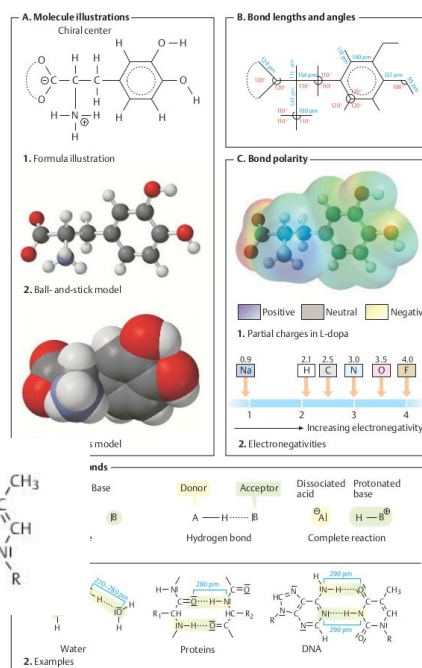
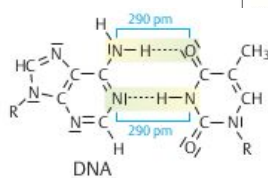
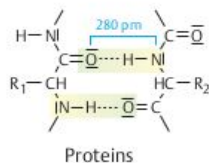
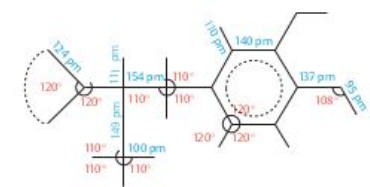
Inhibicja niekompetycyjna

- Gdy inhibitor oddziałuje z ważnym dla katalizy elementem/grupą funkcyjną powoduje on zmniejszenie ilości funkcjonalnego enzymu w środowisku.
- Wyróżniamy:
 - inhibitory odwracalne modyfikujące enzym,
 - inhibitory nieodwracalne, samobójcze powodujące trwałą deaktywację enzymu.
- W tym przypadku K_m pozostaje niezmiennione a V_{max} zmniejsza się.

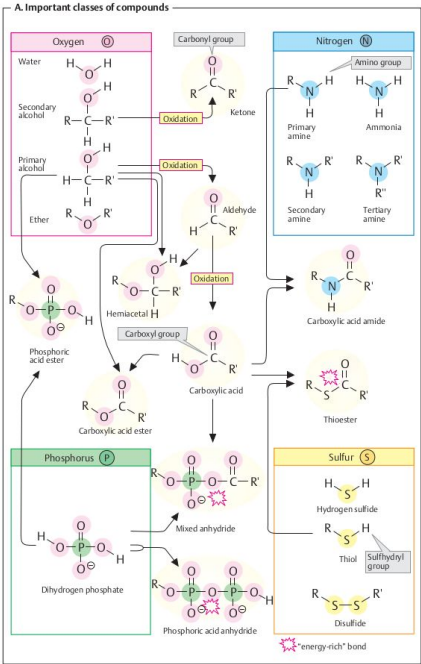


- Inhibicja kompetycyjna: $V_{\max}$ pozostaje bez zmian, rośnie K_m .
Wykresy z inhibitorem i bez spotykają się w wartości $V_{\max}$
- Wykres dla inhibitora niekompetycyjnego jest równoległy do oryginalnego, co oznacza, że K_m się nie zmienia, jednak $V_{\max}$ znacząco spada.

© 2006 The Authors
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd



Biocząsteczki
 i ich właściwości



UniProtKB statistics

UniProtKB
 BLAST Align Peptide search ID mapping SPARQL

UniProtKB
 Examples: Insulin, APP, Human, P05067, organ

UniProt is the world's leading high-quality, comp

Introduction

This is release 2024_01 of UniProtKB, published on Wed Jan 24 2024.

Previous release statistics are available from the UniProt FTP server.

Throughout this document, whenever a statistic has a corresponding query, a link has been provided. In some instances, due to the nature of the sta

Total number of entries in this release of UniProtKB

Section	Number of entries in total	Number of entries with an annotation update	Number of entries with a sequence update
UniProtKB	250,322,721	161,118,372	1,287
Reviewed (Swiss-Prot)	570,830	433,476	169
Unreviewed (TrEMBL)	249,751,891	160,684,896	1,118

Total number of new entries in this release of UniProtKB

Section	Number of new entries	Number of new sequences
UniProtKB	3,922,146	3,922,117
Reviewed (Swiss-Prot)	415	386
Unreviewed (TrEMBL)	3,921,731	3,921,731

Proteins
 UniProt Knowledgebase

Reviewed (Swiss-Prot)
 570,830

Unreviewed (TrEMBL)
 249,751,891

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

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

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

Supporting Data

Human diseases

Taxonomy

Cross-referenced databases

Keywords

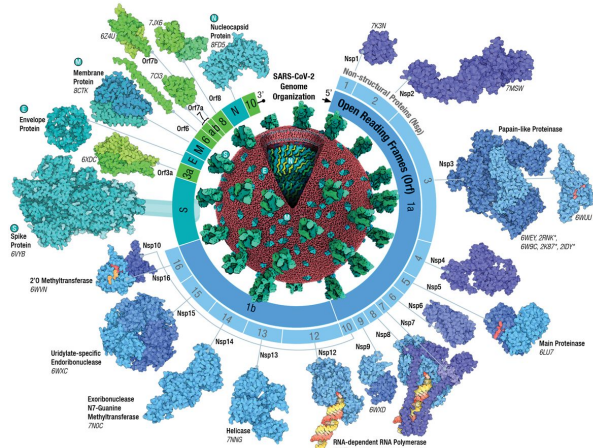
Subcellular locations

Literature Citations

Automatic annotations: UniRule & ARBA

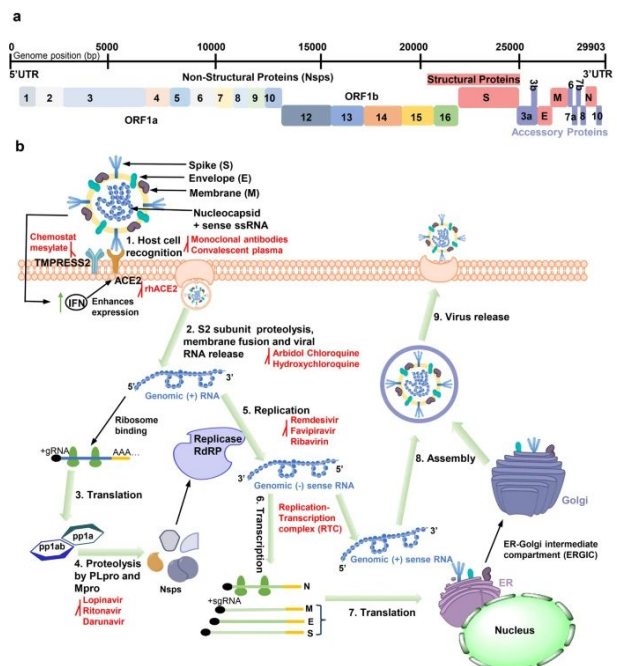
Znaczenie danych strukturalnych

- SARS-CoV 2002
>170 SARS-CoV structuresPD
- MERS-CoV 2012
>100 MERS-CoV structuresP
- COVID-19 2019
>3,000 SARS-CoV-2 structures
- Określenie pokrewieństwa
- Projektowanie szczepionek
- Identyfikacja leków przeciwwirusowych



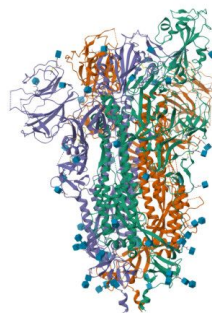
Koronawirus SARS-CoV-2 genom

- Genom: RNA
- Białka strukturalne kodowane oddzielne
- Białka funkcjonalne kodowane jako polipeptyd
- MP: main protease
- PL: papain like proteinase



Strategie wykorzystujące dane strukturalne

- Szczepionka
identyfikacja immunogennego elementu
- Zastosowanie leków przeciwwirusowych



- 6VSB
Prefusion
2019-nCoV spike glycoprotein with a single receptor-binding domain up

- 6LU7
The crystal structure of COVID-19 main protease in complex with an inhibitor N3

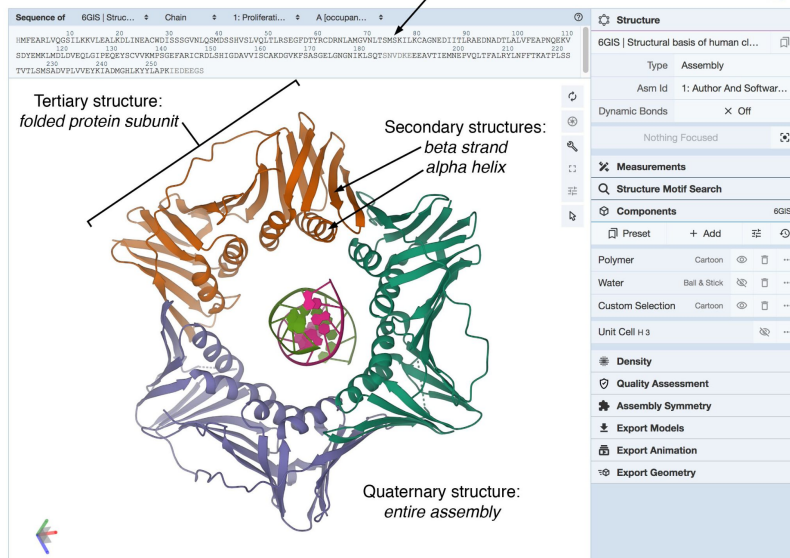


Organizacja molekularna

6GIS

Structural basis of human clamp sliding on DNA

Primary structure:
amino acid sequence



CATH

- Wyszukiwanie
 - Text or ID
 - FASTA
 - Structure
- Wynik
 - “domeny”
 - “elementy funkcjonalne”
 - “ścieżka ewolucyjna”

CATH / Gene3D v4.3
151 million protein domains classified into 5,841 superfamilies

Search by keywords, PDB code, GO term, etc.

CATH annotations for the 21 model organisms predicted by AlphaFold (v2) are available to download (doi:10.1038/s42003-023-04488-9). Core classification files for the latest version of CATH-Plus (v4.3) are available to download. Daily updates of our very latest classifications are also available.

3D Structure
Find out what 3D structure your protein adopts.
Find out more | Go

Protein Evolution
Learn about a particular protein family and how it evolved.
Find out more

Protein Function
Investigate the function of your protein.
Find out more | Go

Conserved Sites
Look at protein sites that are highly conserved and implicated in function.
Find out more | Go

Download Data
Download data files and query CATH via web services.
Go

Learn more
Find out how CATH is created and maintained, how to link to CATH and more.
Go

What is CATH-Gene3D?
CATH is a classification of protein structures downloaded from the Protein Data Bank. We group protein domains into superfamilies when there is sufficient evidence they have diverged from a common ancestor.
• Search CATH by text, ID or keyword
• Search CATH by protein sequence
• Search CATH by PDB structure
• Browse CATH Hierarchy
• CATH Release Statistics
• CATH Tutorials
Gene3D uses the information in CATH to predict the locations of structural domains on millions of protein sequences available in public databases. This allows us to include additional annotations to the CATH-Gene3D database such as functional information and active site residues.
• Go to Gene3D
• Compare Genomes
• Download Gene3D Data
• Learn how Gene3D is created
If you have any questions, comments or suggestions please get in touch via Twitter, ask a question in our online forum or visit our support page.

Latest Release Statistics

	CATH-Plus 4.3.0	CATH (quality snapshot)
PDB Release	01-07-2019	5 months ago
Domains	500235	538613
Superfamilies	5451	6031
Annotated PDBs	150055	100379

Gene3D v21

Protein Sequences	32,885,324
CATH Domain Predictions	151,513,797

Domena

DOMAIN
EVSB A:335-526
SCOP ID: 1030465

Spide glycoprotein
Spidein: Spidein acute respiratory syndrome coronavirus 2
Show ancestry

Representative sequence: Other domains for this sequence: External links

UniProt P0DTC2
This domain

DOMAIN
EVSB A:335-526
SCOP ID: 1030465

Spide glycoprotein
Spidein: Spidein acute respiratory syndrome coronavirus 2
Show ancestry

Representative sequence: Other domains for this sequence: External links

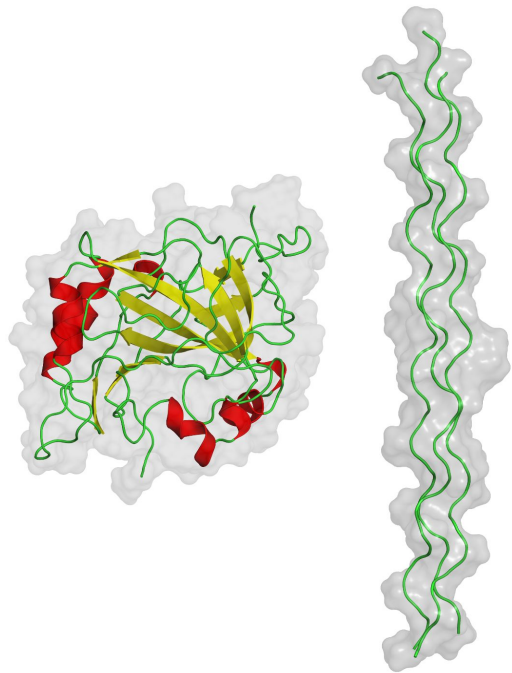
UniProt P0DTC2
This domain

EVSB A:335-526
EVSB A:27-293
EVSB A:717-1066
EVSB A:717-1066
EVSB A:1074-1146
EVSB A:1074-1146
EVSB A:529-592
EVSB A:529-592
EVSB A:533-609
EVSB A:593-699

Superfamily domain | Family domain

Strukturalne rodzaje białek

- Globularne
białko globularne, białko o kształcie kulistym lub sferoidalnym, zbudowane z gęsto pofałdowanych lub pozwijanych łańcuchów peptydowych; wartość stosunku osiowego cząsteczki nie przekracza 3 : 1 lub 4 : 1; do b. g. należy ogromna większość białek, m.in. albuminy i globuliny oraz wszystkie enzymy.
- Fibylarne
białka proste o strukturze włóknkowej stanowiące podstawowy materiał budulcowy organizmów zwierzęcych. Są to typowe białka o budowie włóknistej, dzięki temu pełnią funkcje podporowe. Do tej grupy białek należy keratyna, kolagen, miozyna i fibroina.

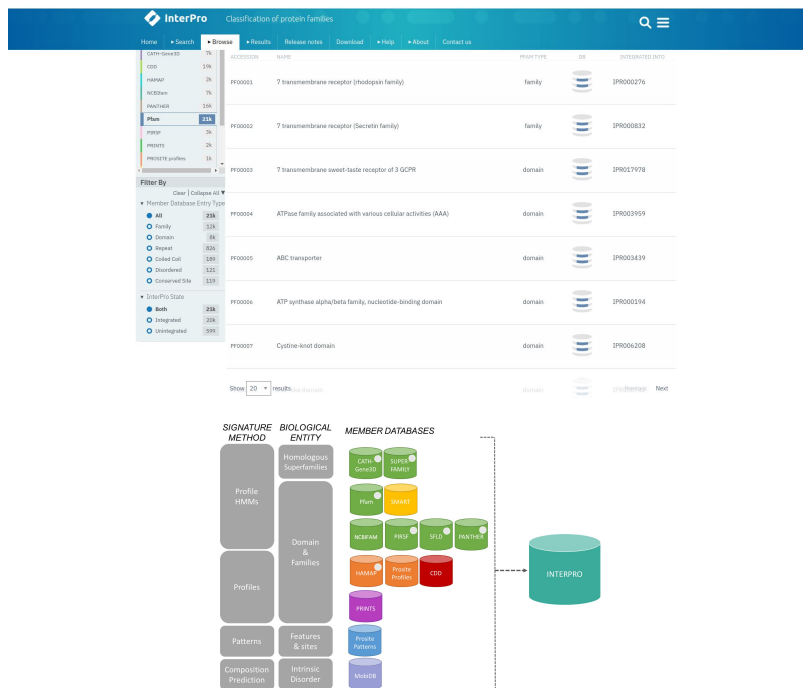


Domena

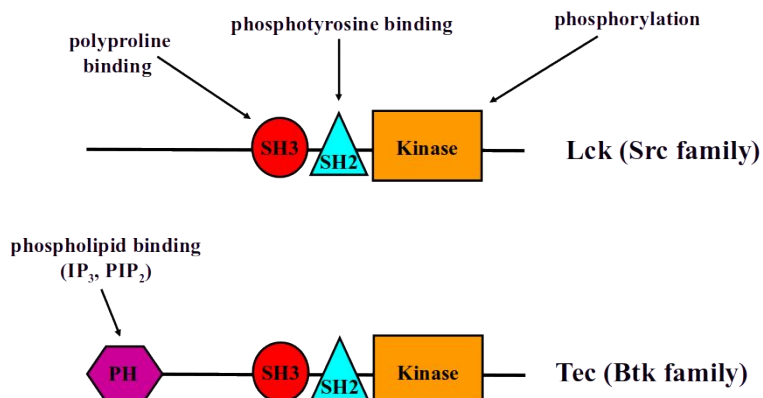
- Motyw strukturalny (lub funkcjonalny) białek.
- Powtarzalny układ (motyw) aminokwasów zachowany w strukturze lub sekwencji.
- Funkcja... często nieznana.
- Występowanie... zazwyczaj 2-5 na białko.

InterPro/Pfam

- InterPro
to baza danych rodzin białek, domen białkowych i miejsc funkcjonalnych, w której możliwe do zidentyfikowania cechy znalezione w znanych białkach można zastosować do nowych sekwencji białkowych w celu ich funkcjonalnego scharakteryzowania.
- Pfam
to baza danych rodzin białek, która zawiera ich adnotacje i wielokrotne wyrównania sekwencji wygenerowane przy użyciu ukrytych modeli Markowa. Wersja Pfam 36.0, została wydana we wrześniu 2023 roku i zawiera 20 795 rodzin.

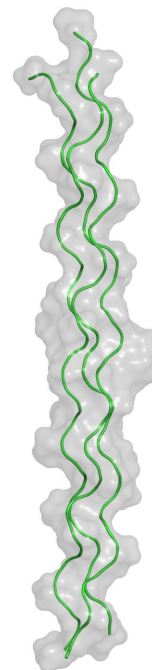


Modularność białek



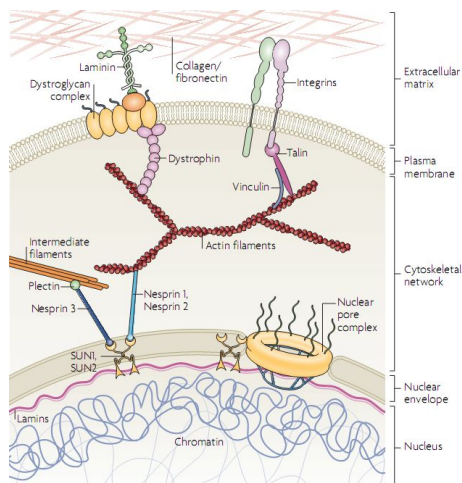
Strukturalne rodzaje białek

- **Globularne**
białko globularne, białko o kształcie kulistym lub sferoidalnym, zbudowane z gęsto pofałdowanych lub pozwijanych łańcuchów peptydowych; wartość stosunku osiowego cząsteczki nie przekracza 3 : 1 lub 4 : 1; do b. g. należy ogromna większość białek, m.in. albuminy i globuliny oraz wszystkie enzymy.
- **Fibrylarne**
białka proste o strukturze włóknkowej stanowiące podstawowy materiał budulcowy organizmów zwierzęcych. Są to typowe białka o budowie włóknistej, dzięki temu pełnią funkcje podporowe. Do tej grupy białek należy keratyna, kolagen, miozyna i fibroina.



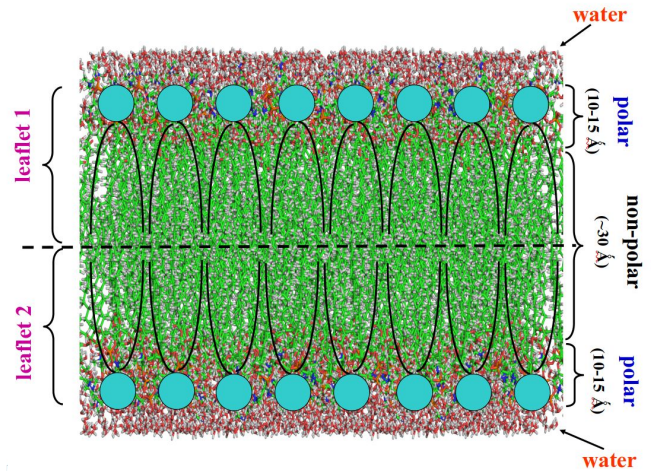
Wykorzystanie białek fibrylarnych

- Wsparcie mechaniczne i ochrona
 - cytoszkielet, np. keratyna
 - macierz pozakomórkowa, np. kolagen
- Budowa struktur komórkowych
- Komunikacja wewnątrzkomórkowa
- 'Ruch'
- Budowa struktur zewnętrznych, np. jedwab
- Funkcje regulacyjne
 - pigmentacja
 - wzrost włosów
 - regeneracja nabłonka



Błona komórkowa

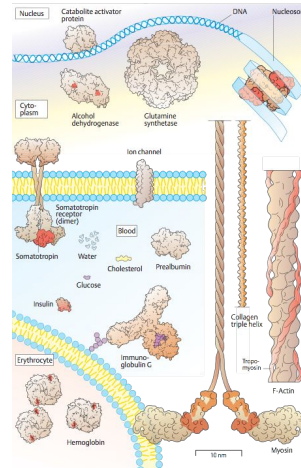
- Błona biologiczna, biomembrana lub błona komórkowa to selektywnie przepuszczalna błona, która oddziela wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego lub tworzy przedziały wewnątrzkomórkowe, służąc jako granica między jedną częścią komórki a drugą.
- Błony biologiczne, w postaci błon komórek eukariotycznych, składają się z dwuwarstwy fosfolipidowej z wbudowanymi, integralnymi i peryferyjnymi białkami wykorzystywanymi w komunikacji i transporcie substancji chemicznych i jonów. Większość lipidów w błonie komórkowej zapewnia płynną matrycę dla białek, które mogą się obracać i dyfundować na boki w celu fizjologicznego funkcjonowania.
- Białka są przystosowane do wysokiej płynności środowiska dwuwarstwy lipidowej z obecnością pierścieniowej otoczki lipidowej, składającej się z cząsteczek lipidów ściśle związanych z powierzchnią integralnych białek błonowych. Błony komórkowe różnią się od izolujących tkanek utworzonych przez warstwy komórek, takich jak błony śluzowe, błony podstawne i błony surowicze.



Synteza białek
Kierowanie białek

Peptydy i białka

- Tworzenie i utrzymywanie struktury.
 - Kolagen.
 - Histony.
- Transport.
 - Hemoglobina.
 - Prealbumin.
 - Kanaly jonowe.
- Ochrona i obrona.
 - IgG.
- Kontrola i regulacja.
 - Hormony i ich receptory.
 - Kataboliczne aktywatory.
- Kataliza.
- Ruch.
 - Filamenty aktynowe.
- Przechowywanie.

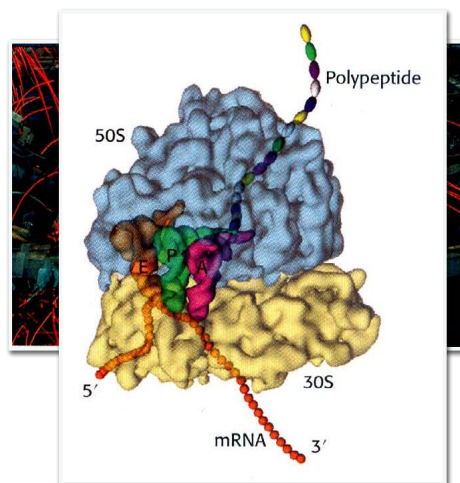


Szybkość procesu

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.

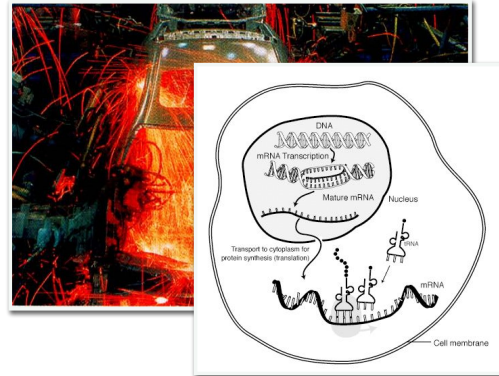


Transportujący RNA (tRNA)

· 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.

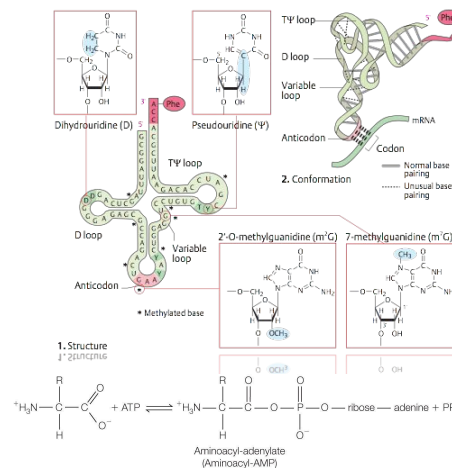
· tRNA transferowe RNA - to cząsteczki adapterowe, oddziałujące ze swoistymi kodonami i dostarczające aminokwasy w celu ich włączenia do łańcucha polipeptydowego.

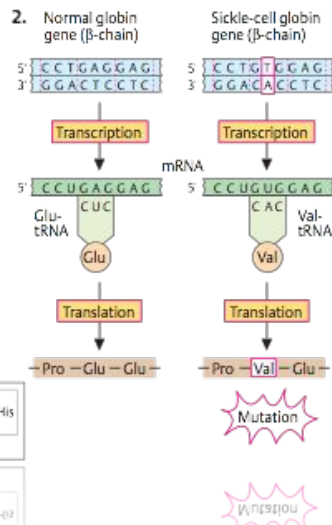


Struktura tRNA

· Niesparowane nukleotydy tworzą 5 grup:

- ramię antykodonowe;
- ramię D lub DHU zawierające *dihydrouracyl*;
- ramię T lub TψC zawierające *pseudouridyne*;
- ramię zmienne;
- ramię aminokwasowe.





Rybosom

To molekularna maszyna koordynująca pracę trzech elementów:

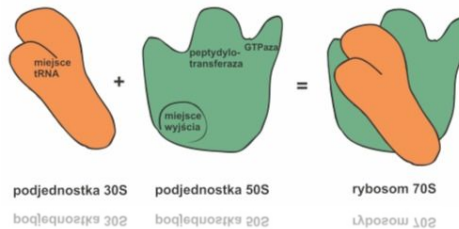
- mRNA;
- tRNA;
- enzymów.

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 odśrodkowych w ultrawirówkach



Rybosom

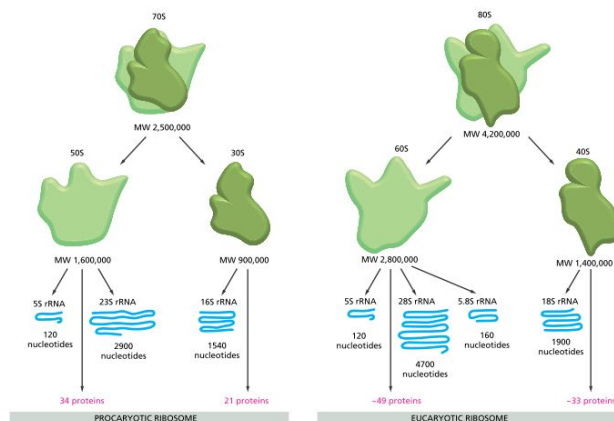
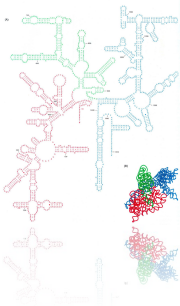
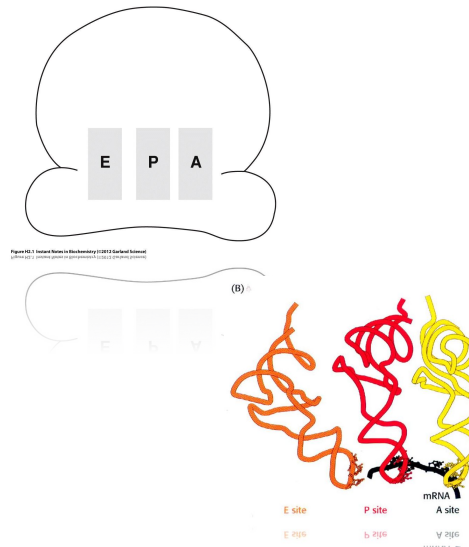


Figure 6-63 A comparison of prokaryotic and eukaryotic ribosomes. Despite differences in the number and size of their rRNA and protein components, both prokaryotic and eukaryotic ribosomes have nearly the same structure and they function similarly. Although the 18S and 28S rRNAs of the eukaryotic ribosome contain many nucleotides not present in their bacterial counterparts, these nucleotides are present as multiple insertions that form extra domains and leave the basic structure of each rRNA largely unchanged.

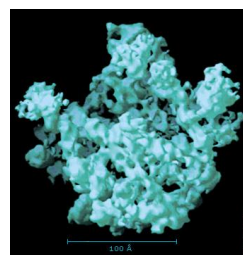
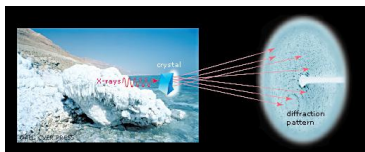
prokaryotic ribosome of eukaryotic ribosome

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.



The Nobel Prize in Chemistry 2009



Venkatraman
Ramakrishnan



Thomas A.
Steitz



Ada E.
Yonath

Inicjacja translacji

Kodonem inicjującym (kodonom 'start') jest AUG.

W zależności od pozycji w sekwencji Met jest dostarczana przez tRNA:

• $tRNA_f^{Met}$ czyli inicjatorowe tRNA;

• $tRNA_m^{Met}$;

U eukariotów sekwencja Shine-Dalgarno dodatkowo 'kieruje' mRNA w kierunku 16S rRNA.

U prokariotów pierwszym aminokwasem białka jest *N*-formylometionina (*fMet*).

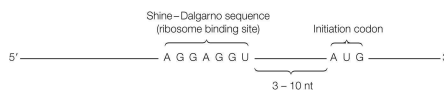


Figure H2.3 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

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

- inicjatorowe tRNA, *N*-formylometionina, wiąże się z IF2 i GTP ($fMet\ tRNA_f^{Met}/IF2/GTP$),
- 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 GTP w efekcie czego powstaje kompleks inicjujący 70S.

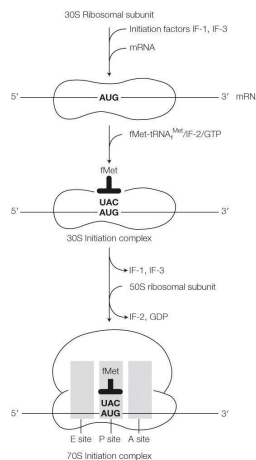
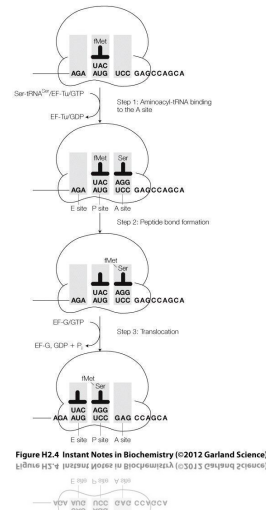


Figure H2.3 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

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)* oraz GTP wiążą się z rybosomem.



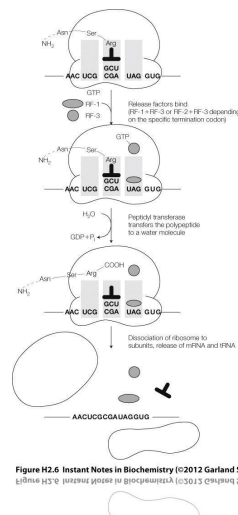
Terminacja

W momencie napotkania kodony 'Stop' w miejscu A do miejsca aktywnego A wiąże się jeden z dwóch *czynn timerów 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.

RF2 rozpoznaje UGA.



Synteza białek u eukariotów

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

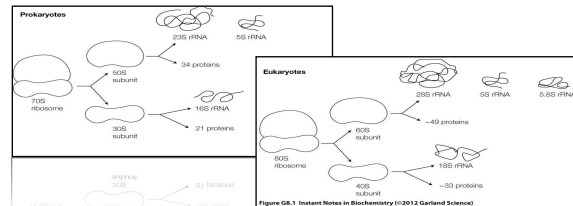


Table 1. Comparison of protein synthesis factors in prokaryotes and eukaryotes

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-1α	Aminoacyl-tRNA delivery to ribosome
EF-Ts	eEF-1βγ	Recycling of EF-Tu or eEF-1α
EF-G	eEF-2	Translocation
Termination factors		
RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3	Polypeptide chain release

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

RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3	Polypeptide chain release
RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3	Polypeptide chain release
RF-1, RF-2, RF-3	eRF-1, eRF-3	Polypeptide chain release

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
- bun wewnętrzną,
- przestrzeń międzybłonową,

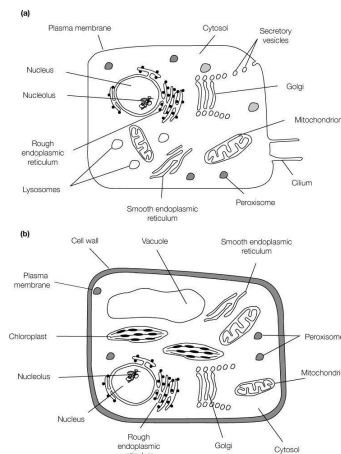
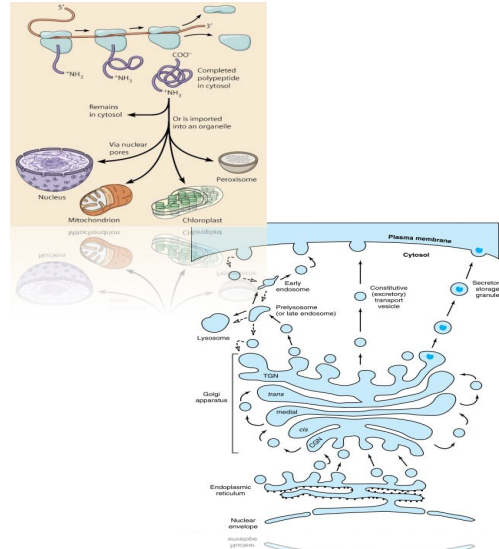


Figure A2.1 Instant Notes in Biochemistry (©2012 Garland Science)

Mechanizm transportu u eukariotów

Nowo zsyntetyzowane białko jest wbudowywane w błonę ER albo wrzucane do światła ER bezpośrednio z rybosomów związanych z błoną ER (szorstkie ER).

- białka, których docelowe miejsce jest poza ER wychodzą w pęcherzykach odrywających się od ER gładkiego i systemem pęcherzykowym przechodzą przez aparat Golgiego (wchodzą od strony *cis* wychodzą *trans*). Po stronie *trans* białka są segregowane i sortowane do odpowiednich kompartmentów.
- białka sekrecyjne akumulowane są w pęcherzykach sekrecyjnych, z których zostaną wyrzucone za błonę.
- białka błony komórkowej wędrują do niej w pęcherzykach transportujących.
- białka lizosomowe dostają się tam poprzez pęcherzyki – późne endosomy.



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 *translokonom* kieruje białko do wnętrza ER.
- Peptyd sygnałowy zostaje obcięty po wewnętrznej stronie ER przez *peptydazę sygnałową*.

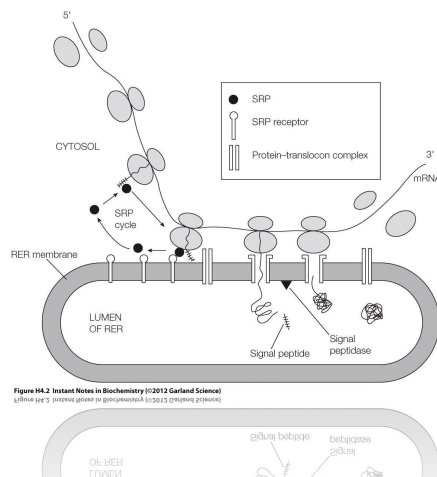


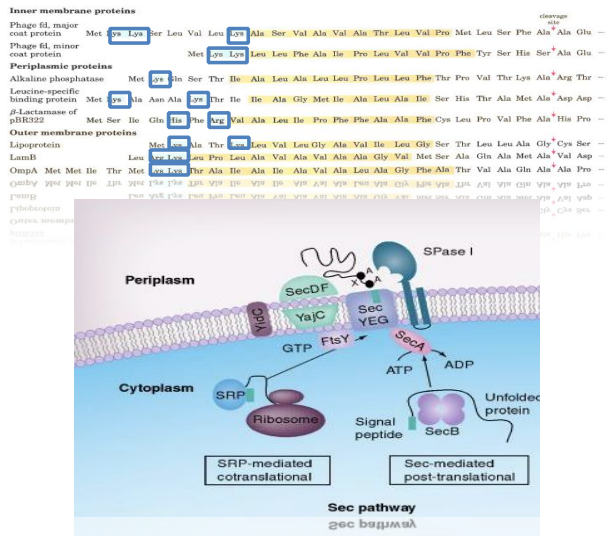
Figure 19-2 Instant Notes in Biochemistry (© 2012 Garland Science)

Lifshitz and T. Lewin, General and Comparative Biochemistry, 6th ed., Garland Science, 2012

Mechanizm transportu u prokariota | Sec

Istnieje możliwość transportu w trakcie translacji (kotranslacyjnie).

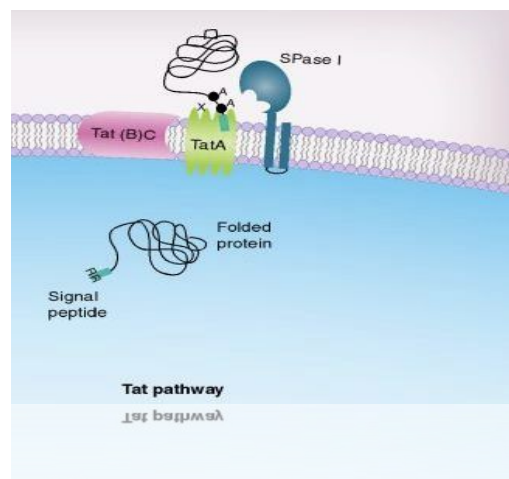
- N koniec białka jest rozpoznawany przez maszynę transportującą w poprzek błony.
- Białka eksportowe mają na końcu N sekwencję liderową (składającą się z części hydrofilowej na końcu N i przylegającej do niej części hydrofobowej)
- Białko podlega zmianom konformacyjnym w czasie transportu np. β -laktamaza (enzym rozkładający ampicylinę) w cytoplazmie i w trakcie przechodzenia przez błonę jest wrażliwa na trawienie trypsyną, natomiast w przestrzeni periplazmatycznej już nie (ma schowane miejsce rozpoznawalne przez tę proteazę).
- Białka, które mają być przetransportowane przez błonę są oplaszczane 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 wpompowane do kanału błonowego a dalszy transport odbywa się na koszt potencjału elektrycznego istniejącego w poprzek błony



Mechanizm transportu u prokariota | Tat

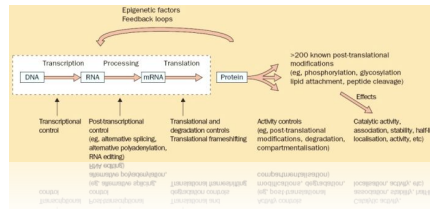
Tat (ang. *twin-arginine translocation pathway*, *Tat pathway*) jest, podobnie jak ścieżka Sec, metodą transportu i wydzielania białek. Występuje one u roślin, bakterii i archei.

W przeciwieństwie do ścieżki Sec białka transportowane w formie sfałdowanej.



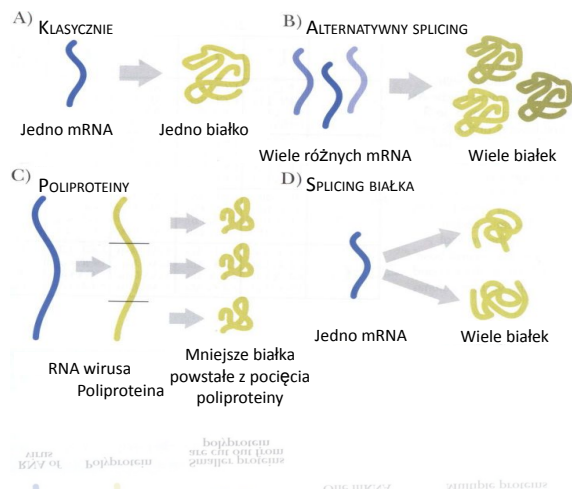
Modyfikacje potranslacyjne

- 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;
 - nityrylacja;
 - lipidyacja;
 - SUMOylacja;
- Podział w zależności od mechanizmu:
 - kowalencyjne przyłączanie grup funkcyjnych;
 - proteolityczne cięcie łańcuchów polipeptydowych;
 - chemiczne modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów;



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.



Modyfikacja kowalencyjne - zestawienie

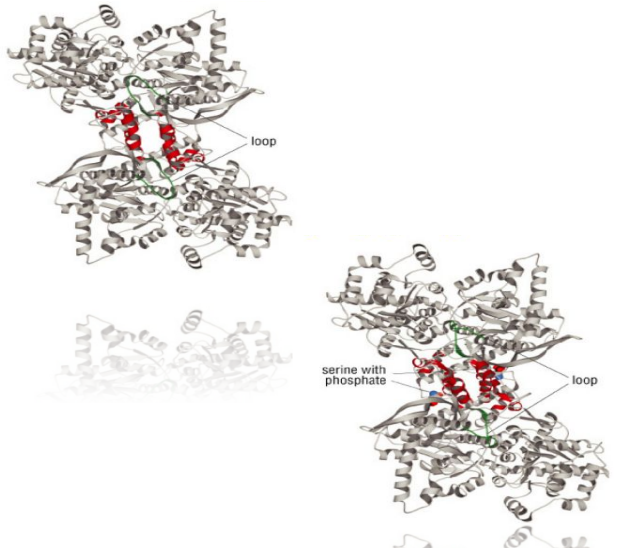
Nazwa modyfikacji	Modyfikowany aminokwas	Opis modyfikacji	Enzym katalizujący reakcję
Fosforylacja /defosforylacja	tyrozyna, treonina, seryna, (histydyna, lizyna, arginina, cysteina)	Przenoszenie grupy γ -fosforanowej z ATP na grupę hydroksylową łańcucha bocznego aminokwasu	Kinazy/fosfatazy
Acetylacja	Lizyna	Przenoszenie grupy acetylowej z acetyloCoA na grupę ϵ -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-mirystyl-transferaza)
Formylacja	metionina	tworzenie N-formylometioniny przez przeniesienie grupy formylowej na N-końców 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: farnesyłacja geranylogeranylacja	cysteina	przyłączanie do białek pochodnych izoprenowych: grupy farnesylowa (C15) lub geranylogeranylowa (C20)	

Modyfikacja kowalencyjne - zestawienie

Nazwa modyfikacji	Modyfikowany aminokwas	Opis modyfikacji	Enzym katalizujący reakcję
Glikozyłacja	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 ϵ -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)
Adenyłacja	tyrozyna, seryna, treonina	przyłączenie AMP do grupy hydroksylowej łańcucha bocznego aminokwasu	transferaza adenyliłowa
Sumoilacja	Lizyna	przyłączenie małej cząsteczki białka SUMO-1 przez wiązanie grupy karboksylowej glicyny z grupą ϵ -aminową białka	enzym sprzęgający
Powstawanie kotwic GPI	C-końce białka	przyłączenie jednostki glikozylfosfatydylinozylitolowej 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 przesuwa się o 50 Å i zmienia powierzchnię kontaktu podjednostek w dimerze – zmiany te powodują aktywację białka

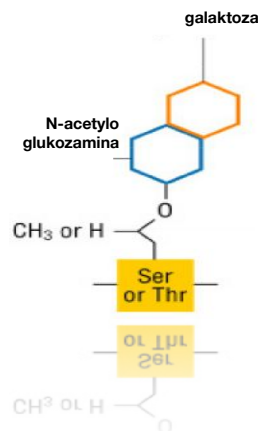


Glikozylacja

- Polega na przyłączeniu reszt cukrowcowych 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 cukrowcowych
 - składzie – typie cukrów dołączonych do białka
 - strukturze – łańcuchy rozgałęzione/nierozgałęzione
 - długości i ilości łańcuchów cukrowcowych
- wyróżnia się dwa podstawowe typy glikozylacji: O- i N-glikozylację
- a także: glikozylację fosfoserynową i C-mannosylację

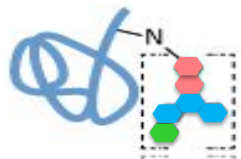
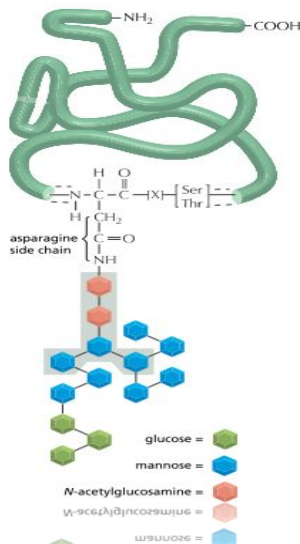
O-glikozylacja

- 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 akceptorem-substratem dla następnej glikozylotransferazy
- typ i liczba dodanych monosacharydów zależy od substratu białkowego oraz typów glikozylotransferaz



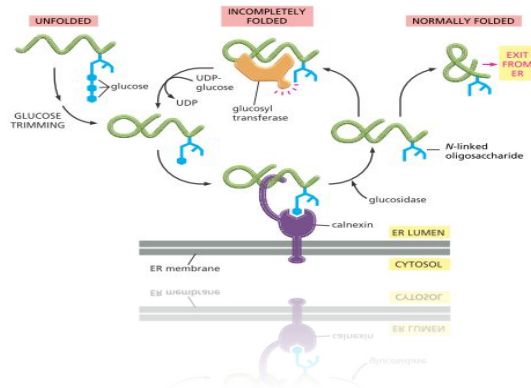
N-glikozylacja

- 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 asparaginu w sekwencji AsnXSer lub AsnXThr
- część cukrowcowa N-glikoprotein jest większa i bardziej skomplikowana niż O-glikoprotein
- przebiega w kilku etapach:
 - składanie prekursora – pierwszy dołączany 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: Gc3Man9GlcNAc2-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 sfaldowane. Wszystkie prawidłowo sfaldowane glikoproteiny przechodzące do aparatu Golgiego mają sekwencję Man9GlcNAc2
 - dojrzewanie 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 glikozyłowe pochodzące z UDP-cukrów



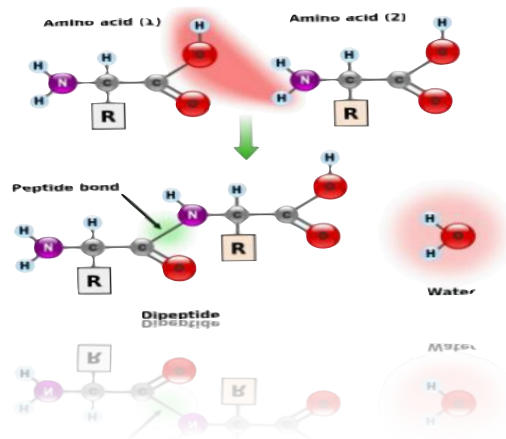
N-glikozylacja

- przyłączanie i odłączanie reszt cukrowcowych jest sposobem na sprawdzenie czy białko prawidłowo się sfaldowało – 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 faldować
- następnie glikozydaza przecina wiązanie łączące mannozę z glukozą odłączając tym samym czaperony od białka
- jeżeli białko nie jest prawidłowo sfaldowane to zostaje rozpoznane przez glikozylotransferazę UDP-glukozy-glikoproteinową, która dołącza resztę glukozy, dzięki czemu białko ponownie jest rozpoznawane przez czaperony i cykl faldowania się powtarza. Cykl może być powtarzany wielokrotnie, w momencie kiedy białko jest prawidłowo sfaldowane, 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



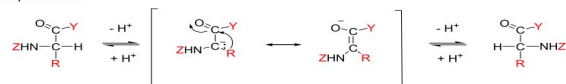
Synteza chemiczna

- 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*)

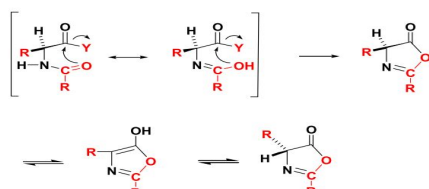


Racemizacja

1 Bezpośrednia



2 Pośrednia przez azolaktion



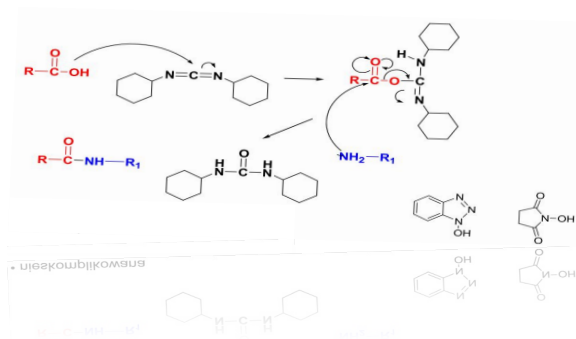
Z – osłona grupy amionowej
Y – osłona grupy karboksylowej
R – reszta aminokwasowa

Racemizacja to proces powstawanie mieszanin enancjomerów z substratów będących czystymi enancjomerami.

Wiązanie peptydowe

Metoda karbodiimidowa
(dicykloheksylokarbodiimid, DCC)

- tania;
- nieskomplikowana;
- produkty uboczne – *N*-acylomocznik, dicykloheksylomocznik;
- *racemizacja* – aby zapobiec dodatki antyracemizacyjne, odpowiedni rozpuszczalnik;

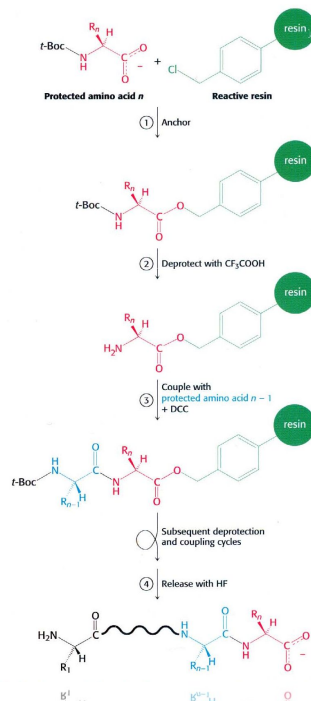
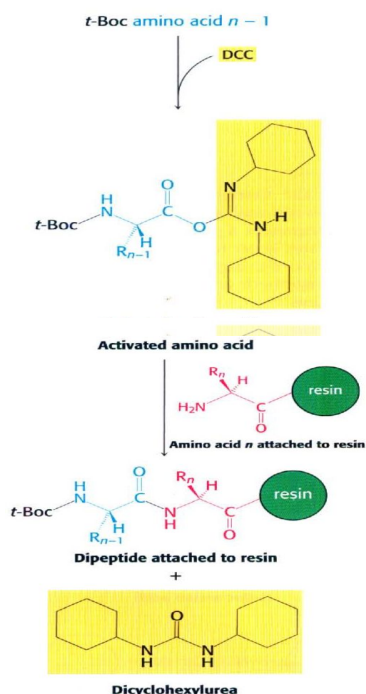


Synteza w fazie ciekłej

- › 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;

Synteza na nośniku stałym

- › 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 trójchlorooctowym;



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
- Niebezpieczeństwo recemizacji
- Bardzo łatwe odzyskanie produktu

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 rozfałdowanie/zdenaturowane jest biologicznie nieaktywne.

W po prawym 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 niefunkcjonalne struktury;

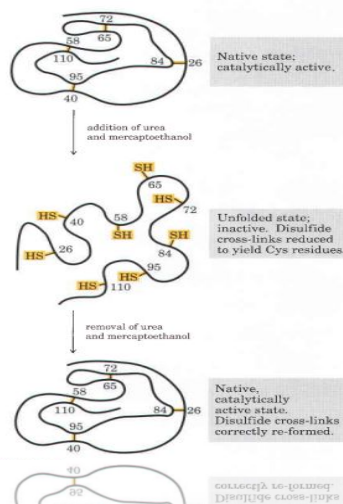
Molekularne czaperony potrzebne są zarówno w trakcie syntezy białka, ale także np. w warunkach stresowych kiedy dochodzi do uszkodzeń. Należą do białek szoku cieplnego (HSP) – odkryto je u bakterii poddanych działaniu wysokiej temperatury.

Fałdowanie białek

Białka fałdujące 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-merkaptetanol mostki dwusiarczkowe.

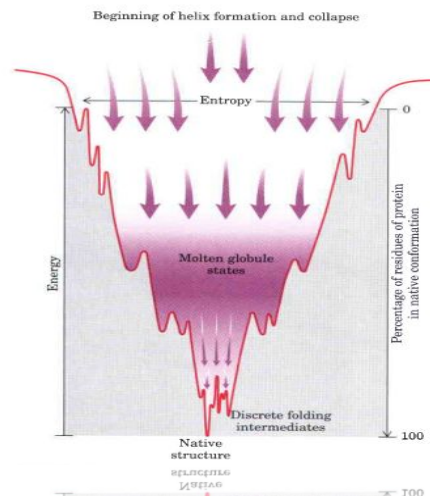
Renaturacja spowodowała odtworzenie mostków dwusiarczkowych w dokładnie tych samych miejscach.



Fałdowanie białek

Termodynamika fałdowania białek

- Na górze wiele różnych konformacji, więc entropia także jest duża;
- W miarę fałdowania, ścieżka termodynamiczna prowadzi w dół lejka;
- Zagłębienia na dnie lejka;

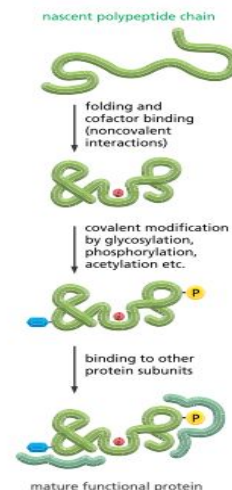


Sekwencja fałdowania

- 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 dopóki nie uwolni się z rybosomu;



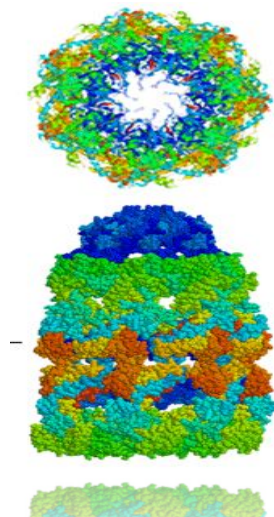
Czaperoniny

Kompleksy białkowe uczestniczące w fałdowaniu nowo powstających białek:

- pracują na koszt hydrolizy ATP
- dzieli się je na dwie grupy: I i II

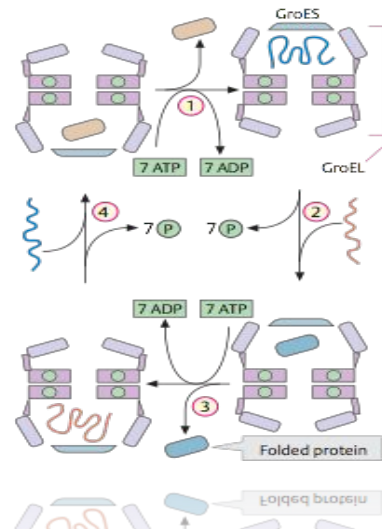
Czaperoniny: Grupa I

- występują u bakterii i w organellach (chloroplastach i mitochondriach);
- najlepiej poznany kompleks 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 ;
- GroES (czaperonina 10) – płaski dysk też z 7 podjednostek;



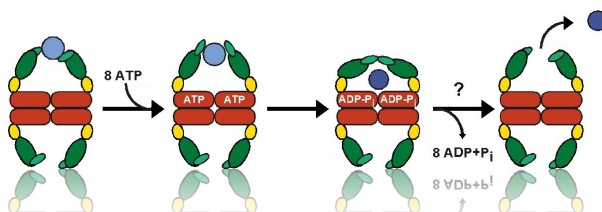
Działanie GroES/GroEL

- 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 oddysocjowanie GroES i uwolnienie sfałdowanego białka z kompleksu;



Czaperoniny: Grupa II

- w cytozolu eukariontów i u archea ;
- nie potrzebują kofaktora w typie GroES do działania;
- przedstawicielem jest TRiC (TCP-1 Ring Complex = CCT Chaperonic Containing TCP-1);
- zbudowany jest z dwóch pierścieni po 8 podjednostek każdy posiadają analogiczne do Gro EL regiony;
- jednak do zamknięcia substratu nie jest wymagany żaden odpowiednik GroES;
- przedstawiciel u *Archea* – Mm cpn (*Methanococcus maripaludis* chaperonin) – też składa się z 18 podjednostek;
- nie wiadomo co robi w naturze, ale jest zdolny do prawidłowego fałdowania rodanazy (białko mitochondrialne);



Nieprawidłowo pofałdowane białka

Choroba

Choroba Alzheimer
 Pląśńwica Huntingtona
 Amyloidoza lizozymowa
 Choroba Parkinsona
 Zakażne encefalopatie gąbczaste
 Amyloidoza nerek
 Stwardnienie zanikowe boczne

Uszkodzone białko

β amyloid
 Huntingtyna
 Lizozym
 α synukleina
 Białka prionowe
 Fibrynogen
 Dysmutaza ponadtenkowa

Degradacja białek

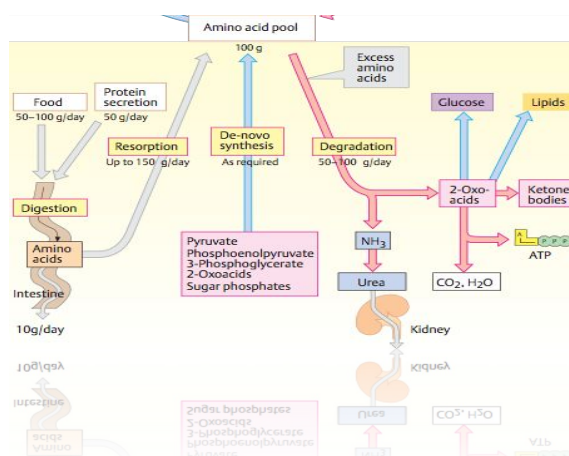
Białka degradowane są do aminokwasów.

Rozkład białek ma dwa aspekty:

- przyswojenie składników pokarmowych;
- recykling składników budulcowych;

Białka komórkowe ulegają degradacji z różną prędkością:

- białka strukturalne są stabilne;
- białka metaboliczne mają krótki okres półtrwania;
- białka sygnałacyjne są ekspresjonowane tylko w celu przekazania sygnału;
- *białka nieprawidłowe muszą być natychmiast zdezaktywowane.*



Regulacja degradacji białek

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

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

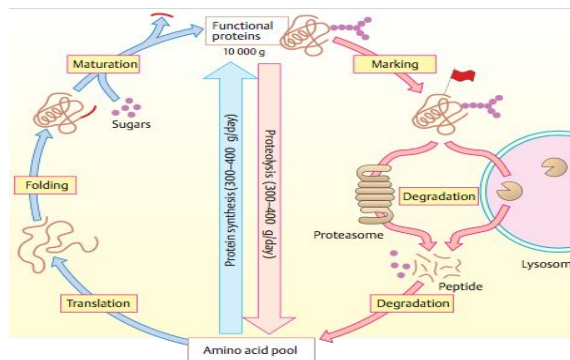
- proteinyazy;
- peptydazy.

Endopeptydasy to enzymy atakujące wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha.

Exzopeptydasy atakują wiązania peptydowe na końcu łańcucha.

W zależności od mechanizmu działania wyróżnia się peptydazy:

- serynowe;
- cysteinowe;
- etc.



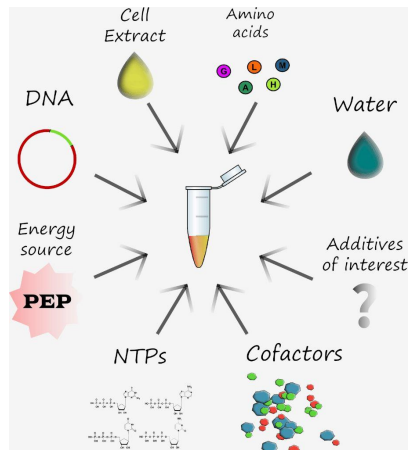
Systemy ekspresji

- białka rekombinowane można produkować w wielu systemach – bakteryjnych, drożdżowych, w roślinach, zwierzętach, komórkach ssaczy lub owadziech
- 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

Systemy ekspresji

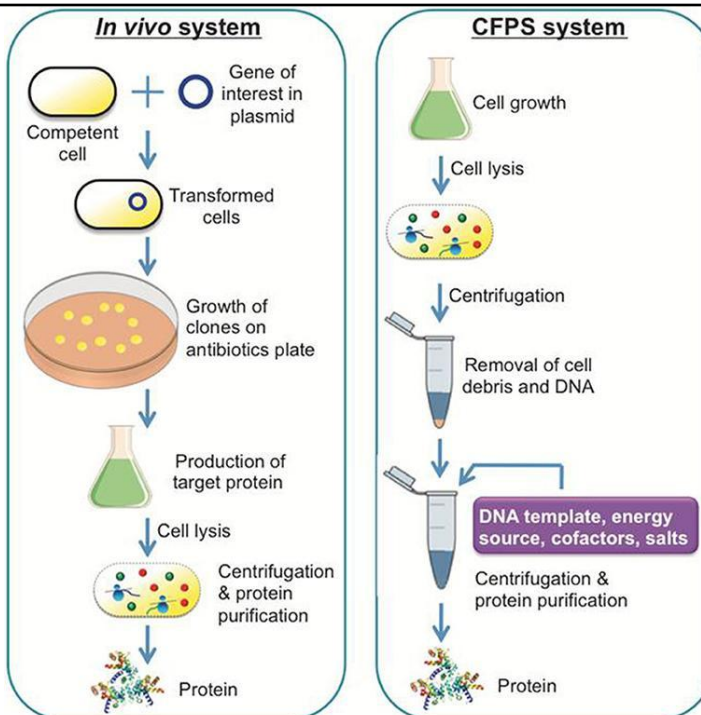
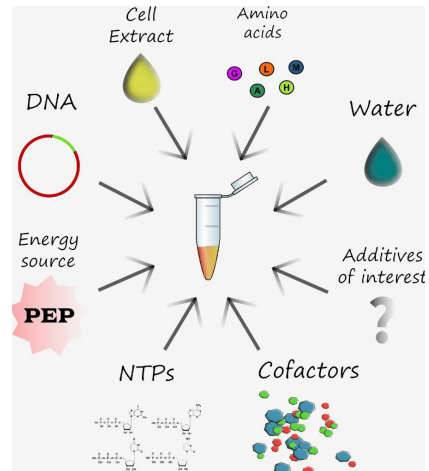
	WORST				BEST		
SPEED	Transgenics	Plants	Mammalian	Insect	Yeast	Bacteria	
COST	Transgenics	Mammalian	Plants	Insect	Yeast	Bacteria	
GLYCOSYLATION	Bacteria		Yeast	Plants	Insect	Transgenics	Mammalian
FOLDING	Bacteria	Yeast	Plants		Insect	Transgenics	Mammalian
FOLDING	Bacteria	Yeast	Plants		Insect	Transgenics	Mammalian

Pozakomórkowe systemy ekspresji białek



CFPS

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



Zastosowanie

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

Functional Genome/ Proteome Analysis

- Gene mutation/deletion analysis (e.g., enzyme kinetics)
- Protein domain mapping
- Characterization of protein interactions
- Gel Shift EMSA
- Generation of protein arrays

Expression of Difficult-to-Express Proteins

- Cell-toxic proteins, membrane protein, viral proteins, kinases

Protein Evolution/ Enzyme Engineering

- Display technologies (e.g., ribosome, mRNA display, in vitro compartmentalization)
- Evolution of antibodies in vitro by ribosome display

Analysis of Transcriptional/ Translational Regulation

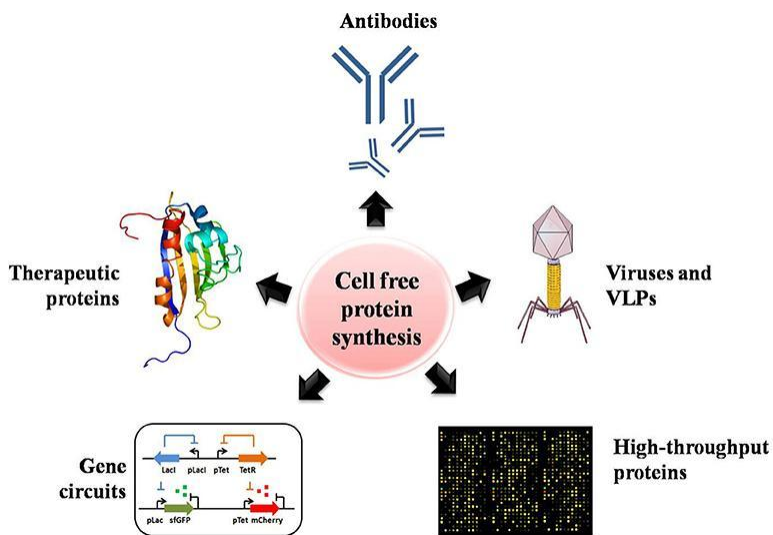
- Structural RNA analysis such as characterization of regulatory elements for translation (e.g., UTRs, Capping, IRES)
- RNA virus characterization

Screenings

- Screening of chemical libraries for effect on translation
- Drug screening (e.g., antibiotics)

Protein Labeling

- Open systems allow the incorporation of labeled amino acids



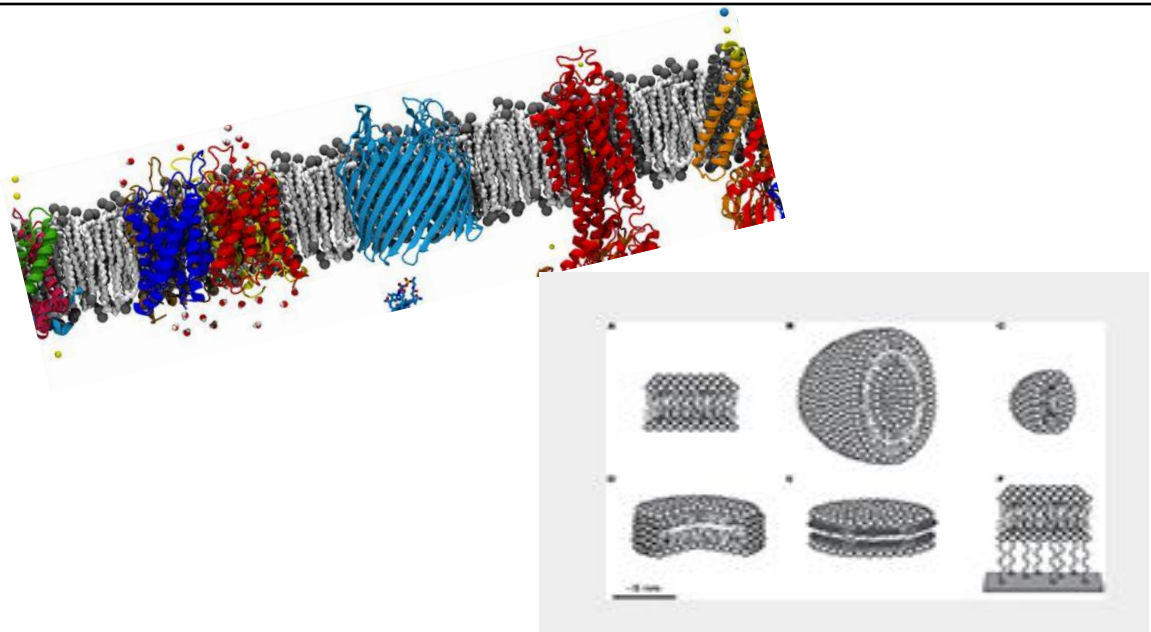
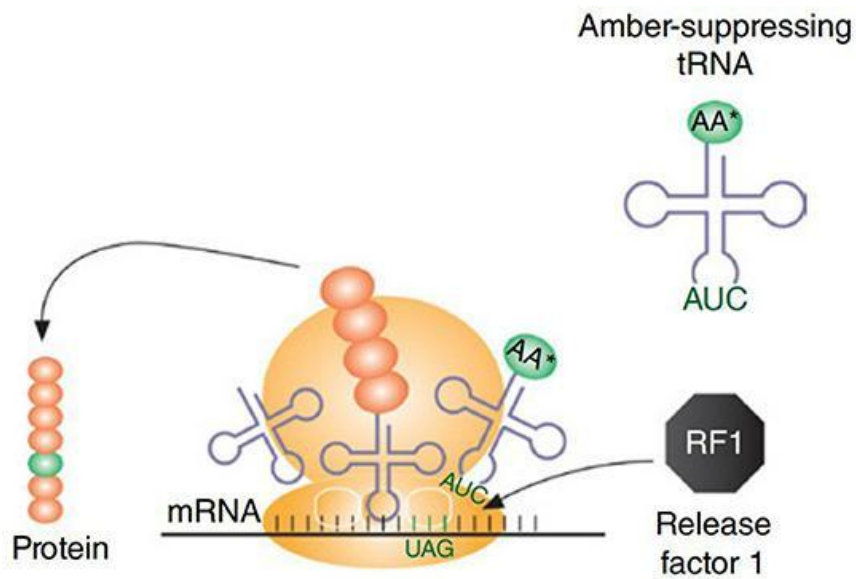


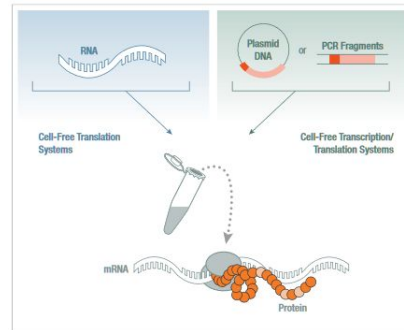
Figure 5. To produce membrane proteins through CFPS platforms, several membrane-mimicking structures are used. (A) Lipid bilayer, (B) liposome, (C) micelle, (D) bicelle, (E) nanodisc, and (F) tethered bilayer lipid membrane. Figure reproduced with permission from (Schoborg and Jewett, 2018) © John Wiley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



Komponenty systemu

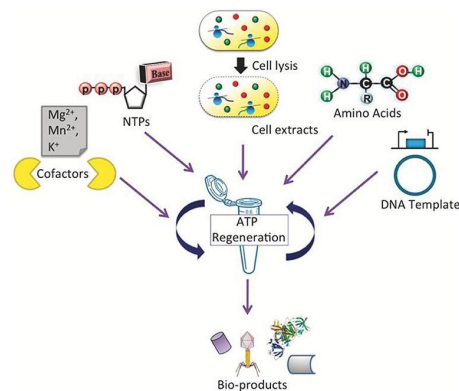
› Niezbędne elementy:

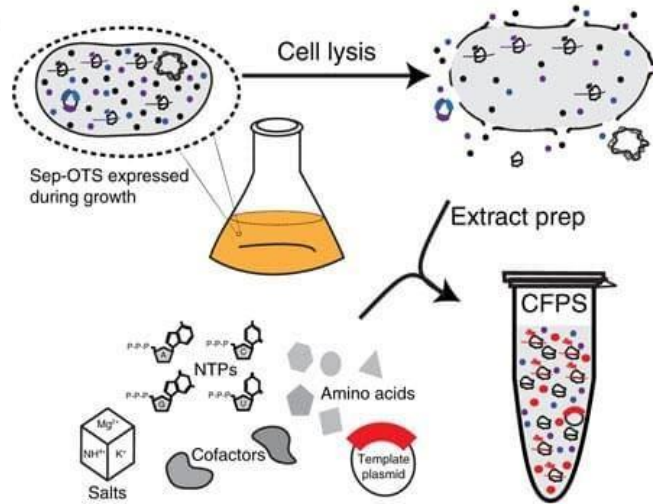
- › Rybosomy
- › tRNA
- › Aminoacylo-tRNA syntetazy
- › Czynniki inicjacji, elongacji, terminacji
- › Aminokwasy
- › Źródła energii (ATP, GTP)
- › Systemy regeneracji energii
- › Sole i inne składniki, np. bufory



Pochodzenie komponentów

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





Szybki start



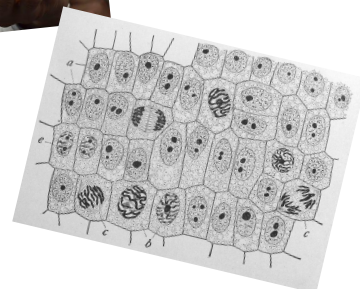
Badania *in vitro*

In vitro

termin stosowany przy opisywaniu badań biologicznych, oznacza procesy biologiczne przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem.

Przykład:

- synteza złożonych związków organicznych.
- praca z żywymi komórkami, wyizolowanymi z organizmu macierzystego i umieszczonymi w warunkach laboratoryjnych umożliwiających podtrzymywanie ich życia.



Hodowla *in vitro*

Hodowla komórkowa

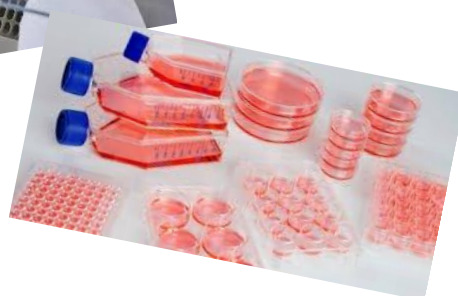
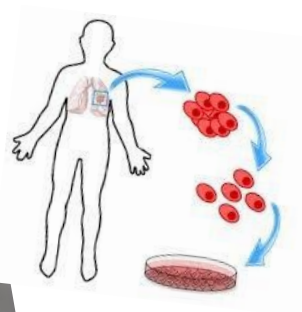
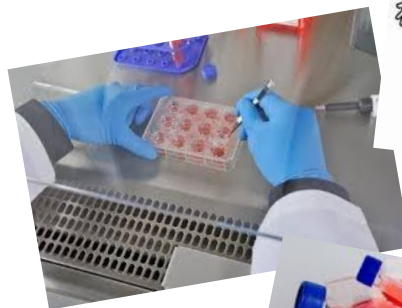
utrzymanie przy życiu komórek poza ich środowiskiem naturalnym, przez umieszczenie ich w odpowiednich pożywkach. Hodowla ta wykazuje się brakiem wytworzenia wyżej zorganizowanych struktur.

Hodowla tkankowa

w ścisłym znaczeniu metoda polegająca na przetrzymywaniu (ponad 24 godz.) poza organizmem (in vitro) fragmentów żywych tkanek roślin lub zwierząt.

Zastosowanie

biologii molekularnej, biologii komórki, cytofizjologii, cytogenetyce, embriologii, onkologii, farmakologii, patologii, toksykologii i inżynierii tkankowej.



Rodzaje linii komórkowych

Linia komórkowa pierwotna

zapoczątkowana pobraniem komórek lub tkanek bezpośrednio z organizmu. W standardowej hodowli niemożliwa do wielokrotnego pasażowania. Przykłady: splenocyty, adipocyty, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej.

Linia komórkowa ustalona

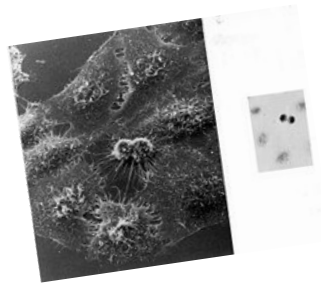
komórki po wielokrotnym pasażowaniu. Najbardziej znane są ustalone linie komórek nowotworowych. Według obecnego stanu wiedzy linie komórek nowotworowych są ciągłe („nieśmiertelne”), to znaczy mogą przechodzić nieskończenie wiele podziałów, jednak ze względu na wysoką niestabilność genetyczną nowotworów po kilkunastu latach pasażowania komórki zmieniają swoje pierwotne właściwości (fenotyp).

Przykłady: HeLa, Caco-2.

HeLa

Henrietta Lacks, właśc. Loretta Pleasant (ur. 1 sierpnia 1920 w Roanoke, zm. 4 października 1951 w Baltimore) – Afroamerykanka, której komórki rakowe dały początek HeLi, pierwszej linii nieśmiertelnych ludzkich komórek.

Materiał do badań pobrano poprzez biopsję szyjki macicy w Johns Hopkins Hospital w Baltimore, w stanie Maryland, w 1951 roku. Komórki te były następnie hodowane przez George'a Otto Geya, którego uważa się za twórcę HeLi. Nigdy jednak nie uzyskano zgody Henrietty na hodowlę jej komórek. Na przestrzeni lat również ani ona, ani jej rodzina nie otrzymali rekompensaty za ich wykorzystanie. Ocenia się, że do dziś (2021) komórki HeLa z ciała Henrietty Lacks wykorzystano w 75 tysiącach doświadczeń naukowych (codziennie liczba ta zwiększa się o 10), a wagę wszystkich wyhodowanych komórek HeLa ocenia się na 50 milionów ton.



Dlaczego linie komórkowe?

- Kontrola środowiska – wszystkie parametry można ustalić i zmierzyć.
- Powtarzalność wyników.
- Możliwość badania funkcji różnych typów komórek, budujących tkanki i narządy.
- Możliwość badania interakcji pomiędzy komórkami wchodzącymi w skład tkanek i narządów.
- Koszt prowadzenia badań in vitro jest znacznie niższy niż koszt badań na zwierzętach.

- Ścisła aseptyka.
- Masowa produkcja komórek (skala biotechnologiczna), jest bardzo kosztowna.
- Długotrwałe hodowle są trudne do utrzymania (ograniczona ilość pasaży).
- Badania Zmudne i czasochłonne.
- Wykwalifikowany personel.



Zalecenia

- Optymalny wzrost komórek wymaga optymalizacji warunków hodowli.
- Odpowiednie medium (RPMI 1640, DMEM) dla wybranej linii komórkowej
 - Składniki podstawowe (aminokwasy, glukoza), witaminy, sole, substancje buforujące.
 - Składniki niestabilne.
- Serum płodowe z cieląt
 - kompleksowa mieszanka albumins, globulins, promotorów i inhibitorów wzrostu.
- Dodatki
 - promotory wzrostu
 - elementy śladowe
 - metabolity i białka
- Inkubator

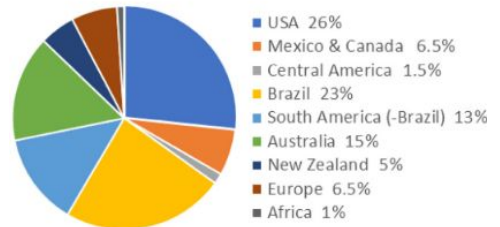
FSB

Serum płodowe z cieląt (z ang. fetal bovine serum – FBS lub fetal calf serum) – jest produktem ubocznym w przemyśle mięsnym i pozyskuje się je poprzez odciagniecie krwi z usuniętego płodu zabitej krowy.

Iglę wbija się wprost do serca płodu, aby zminimalizować zanieczyszczenie serum. Krew zbiera się do aseptycznego pojemnika lub torebki na krew i pozostawia się aby skrzepła. Następnie odwirowuje się w celu usunięcia skrzepów z fibryny.

Serum jest zamrażane, co jest koniecznym etapem w dalszym przetwarzaniu dla potrzeb hodowli komórkowej.

Ma wiele różnorodnych zastosowań w hodowlach komórkowych m.in.: wykorzystywane jako pożywka dla komórek macierzystych w hodowli *in vitro*. W 2008 r. sprzedano na świecie ok. 700 tysięcy litrów FBS.



Komórki owadzie

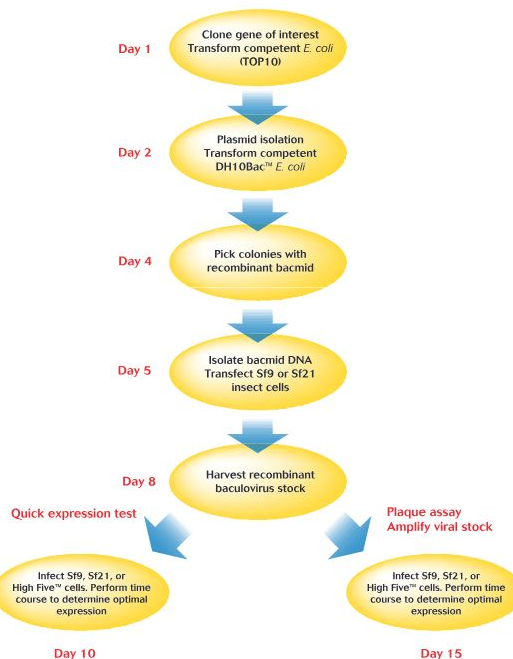
W przypadku białek, które są trudne do ekspresji w *E. coli*, komórki owadzie stanowią dobrą alternatywę. Używamy ekspresji za pośrednictwem bakulowirusa w liniach komórkowych owadów lepidoptera. Linie komórkowe dostępne w naszym ośrodku to komórki Sf9, Sf21 i Hi5. Do generowania rekombinowanego DNA bakulowirusa używamy systemu Bac-to-Bac firmy Thermo.

Protein Expression and Purification Core Facility

PEPCF expresses proteins in bacteria, insect and mammalian cells and uses a variety of chromatographic and biophysical techniques for protein purification and characterization.

Bac-to-Bac

System ekspresji Thermo Scientific.



Plasmidy

System Bac-to-Bac zawiera sześć potężnych wektorów ekspresyjnych. Do rekombinowanej ekspresji białka. PFastBacTM1 Wektor oferuje silny promotor ang. polipolyhedrin dla wysokiego poziomu, natywnej ekspresji białka i duże miejsce klonowania wielokrotnego.

Wektory pDESTTM8, pDESTTM10 i pDESTTM20. Wektory są zaprojektowane do szybkiego klonowania w systemie Gateway przy użyciu specyficznego miejsca rekombinacji.

pDESTTM8 jest przeznaczony do natywnych ekspresji
pDESTTM10 zawiera N-końcowy 6xHIS tag
pDESTTM20 ma N-końcowy tag GST



Schemat działania

Bac-to-Bac System Przegląd

Rekombinowana generacja bakterii:

Osiągnięto przez specyficzną dla danego miejsca transpozycję w *E. coli*, a nie w homologicznej rekombinacji w komórkach owadów.

Kroki procesu :

Gen Cloning: Klonowanie interesującego genu wektor pFastBacTM.

Transformacja: Przekształć wektor pFastBacTM w kompetentny *E. coli*.

DH10BacTM zawiera bakmid z fuzją lacZ-mini-atTn7.

Transpozycja: Przełożenie następuje między wektorem pFastBacTM a bacmidem za pomocą białek plazmidów pomocniczych.

Udana transpozycja zakłóca gen lacZ, umożliwiając łatwą

identyfikację rekombinowanych klonów przez białe kolonie bakteryjne.

Wybór kolonii bakteryjnej: Izoluj kolonie z zakłóconym genem lacZ

(białe kolonie).

Bacmid Isolation: Wyodrębnij DNA o wysokiej masie cząsteczkowej

z wybranych kolonii.

Transfekcyjne komórki owadów Sf9 lub S21 z rekombinowanym

bacmidem za pomocą Cellfectin.

Produkcja bakteriowirusowa: Po dwóch dniach izoluje się czysty,

rekombinowany bakulowirus

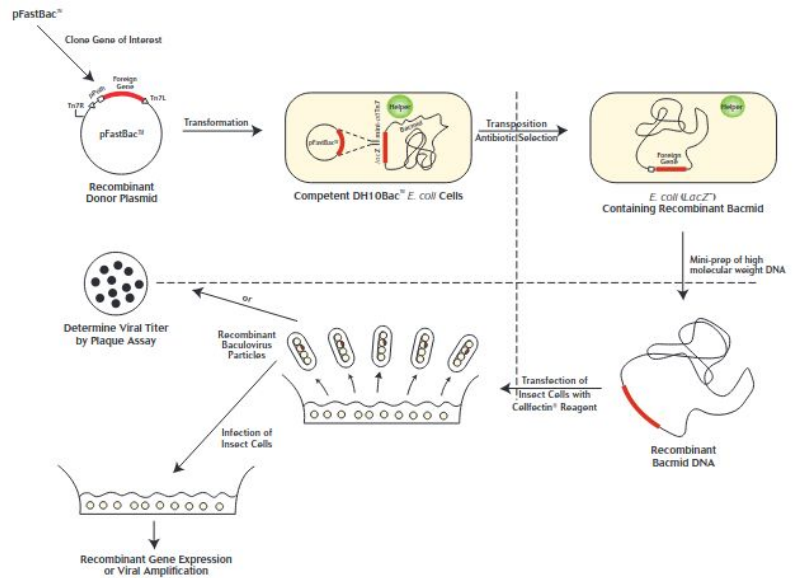
Kluczowe punkty:

Easy Visual Selection: białe kolonie wskazują na

pomyślną transpozycję.

High-Titer Baculovirus: Skuteczna produkcja

rekombinowanego wirusa do ekspresji białka.



Dlaczego linie komórkowe...

● 3R

Reduce
Refine
Replace

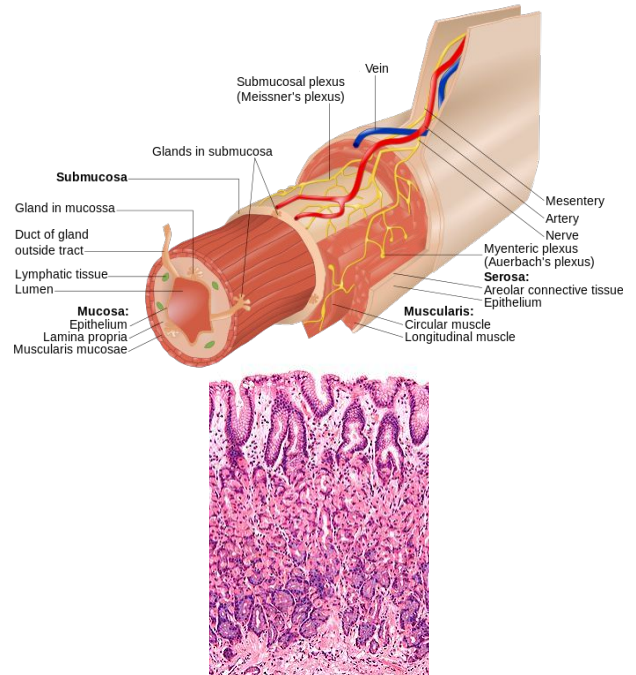


- Kontrola środowiska – wszystkie parametry można ustalić i zmierzyć.
- Powtarzalność wyników.
- Możliwość badania funkcji różnych typów komórek budujących tkanki i narządy.
- Możliwość badania interakcji pomiędzy komórkami wchodzącymi w skład tkanek i narządów.
- Koszt prowadzenia badań in vitro jest znacznie niższy niż koszt badań na zwierzętach.

- Ścisła aseptyka.
- Masowa produkcja komórek (skala biotechnologiczna) jest bardzo kosztowna.
- Długotrwałe hodowle są trudne do utrzymania (ograniczona ilość pasaży).
- Badania żmudne i czasochłonne.
- Wykwalifikowany personel.

Problem...

- (L)ADME
- (L – liberation (uwolnienie))
- **A – absorption (wchłanianie)**
- D – distribution (rozmieszczenie)
- M – metabolism (metabolizm)
- E – excretion lub elimination (wydalanie lub usuwanie)



Transport przez błony biologiczne

Dyfuzji bierna

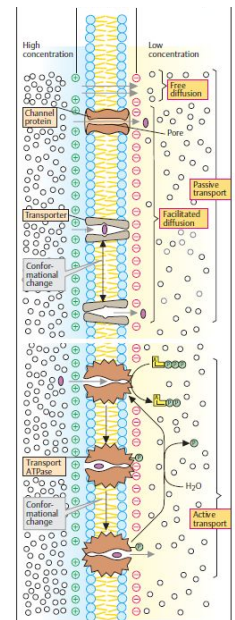
zgodnia z gradientem stężeń, czyli zawsze od stężenia wyższego do niższego i nie wymaga ze strony organizmu nakładów energii. Również z biernym udziałem białek transportowych.

Transport aktywny

wbrew gradientowi stężeń przy udziale nośników i nakładzie energetycznym dostarczonemu przez ATP.

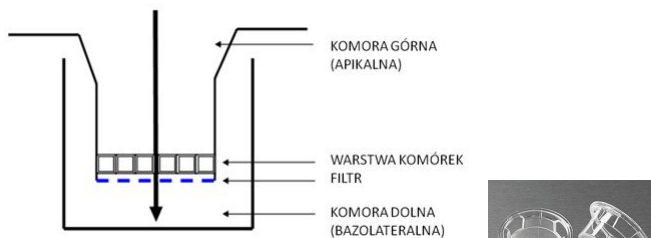
Pinocytozy lub fagocytozy

wnikanie kuleczek cieczy do wnętrza błony – w transporcie leków / suplementów odgrywa małą rolę.



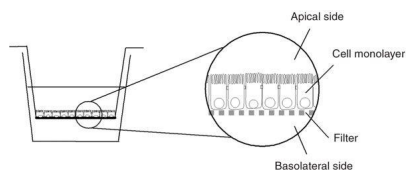
Model przenikania leków / suplementów

- Bariery tkankowe:
- **krw-tkanka**
- krew-mózg
- krew-łożysko
- krew-ciecz wodnista oka



PAPP

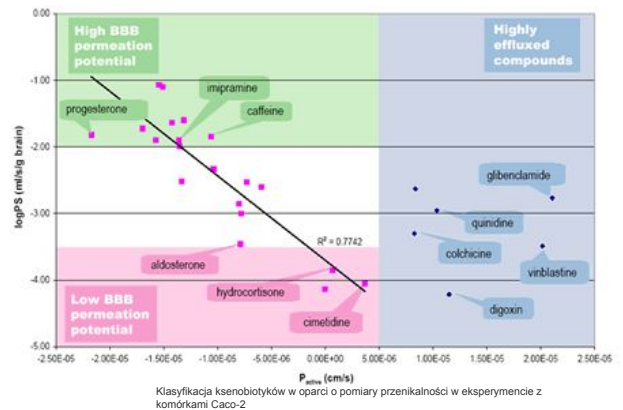
- **Caco-2**
ludzkiego gruczołka okrężnicy (jelito grube).
- Model powszechnie stosowany do określenia stopnia wchłaniania leków podawanych doustnie i innych ksenobiotyków.



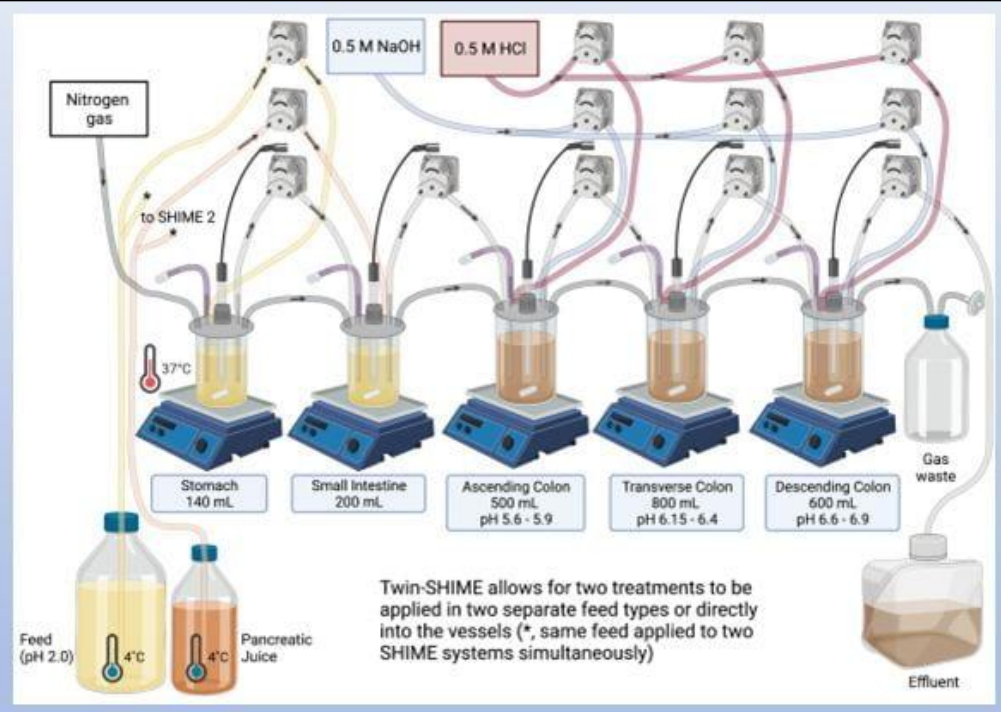
$$P_{app} = \left(\frac{dQ/dt}{C_0 \times A} \right)$$

Klasyfikacja ksenobiotyków

- Poniżej 2×10^6 cm/s
niska przenikalność
- Pomiedzy 2×10^6 cm/s a 20×10^6 cm/s
średnia przenikalność
- Powyżej 20×10^6 cm/s
- wysoka przenikalność



- **OPERATING THE (TWIN)SHIME®**
(Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem)



SHIME

SHIME®, pełna symulacja jelitowej fermentacji jelita grubego do przedklinicznych lub klinicznych badań długoterminowych interakcji mikrobiomu.

Model SHIME® (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) jest obecnie najbardziej reprezentatywną technologią *in vitro* do połączonej symulacji fizjologicznych, chemicznych i mikrobiologicznych właściwości przewodu pokarmowego.

Model umożliwia badanie wpływu długotrwałego powtarzanego dawkowania i modulacji mikrobioty w funkcji lokalizacji jelit.

SHIME® może być postrzegany jako badanie kliniczne *in vitro*, które może zapewnić przestrzenno-czasowy wgląd w mechanizm działania określonego leczenia, dostarczając tym samym danych uzupełniających badania *in vivo*.

SHIME

Trudne do zbadania, ale łatwe do symulacji w SHIME®:

- o skład mikrobiomu błony śluzowej,
- o mikrobiom dysbiotyczny,
- o infekcja patogenem.

Oprócz fizycznie oddzielonych proksymalnych i dystalnych reaktorów okrężnicy, SHIME® można rozszerzyć o "przedział" błony śluzowej (M-SHIME®) symulujący mikros środowisko ściany jelita. Rozszerzenie to pozwala na badanie specyficznych ról nisz śluzówkowych i luminalnych w społeczności drobnoustrojów. Ze względu na różnice w warunkach fizjologicznych, przedziały te są kolonizowane przez specyficzne i różnicowane społeczności drobnoustrojów. Sprawia to, że SHIME® jest doskonałym modelem do oceny lokalizacji efektu leczenia i jego czasowego początku po podaniu wielu dawek dziennych.

Aby zwiększyć wszechstronność zastosowań, technologia SHIME® może być również wykorzystywana do badania wpływu wielokrotnego dawkowania na dysbiotyczne społeczności drobnoustrojów, na przykład od dawców z IBD, lub do badania cyklu infekcji patogenów.

OPERATIONAL PARAMETERS OF SHIME EXPERIMENTS

- Volumes and pH intervals

Host	Configuration	Intestinal compartment	Volume (mL)	pH interval	
				Value	Time (after start of the cycle)
Adult SHIME	Twin	Stomach*	140	1,8-2,2	0h30 – 1h30
		Small intestine*	200	6,5-7,1	2h-3h
		Ascending colon	500	5,6 - 5,9	Continuous
		Transverse colon	800	6,15 - 6,40	Continuous
		Descending colon	600	6,6 - 6,9	Continuous
	Triple	Stomach*	140	1,8-2,2	0h30 – 1h30
		Small intestine*	200	6,5-7,1	2h-3h
		Proximal colon	500	5,6 - 5,9	Continuous
		Distal colon	800	6,6 - 6,9	Continuous

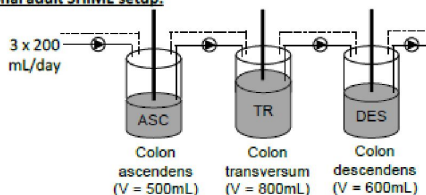
- Time schemes and pump speeds

Liquid transfer	Pump speed	Time scheme	
		After start of each cycle	Actual time schemes
Nutritional medium	4,67 mL/min during 30 min (total volume = 140mL)	0.00-0.30	1.00 - 1.30 9.00 - 9.30 17.00 - 17.30
Pancreatic juice	4 mL/min during 15 min (total volume = 60mL)	1.30-1.45	2.30 - 2.45 10.30 - 10.45 18.30 - 18.45
Stomach – Small intestine	3,5 mL/min during 1h (210mL can be pumped during this 1h interval, which is sufficient to transfer the 140mL)	1.30-2.30	2.30 – 3.30 10.30 – 11.30 18.30 – 19.30
Small intestine – First colon region	3,5 mL/min during 1h15min (262.5mL can be pumped during this 1h15min interval, which is sufficient to transfer the 200mL)	3.00-4.15	4.00 - 5.15 12.00 - 13.15 20.00 - 21.15
First region – second colon region	3,5 mL/min during 1h15min (262.5mL can be pumped during this 1h15min interval, which is sufficient to transfer the 200mL)	3.00-4.15	4.00 - 5.15 12.00 - 13.15 20.00 - 21.15
Second region – third colon region	3,5 mL/min during 1h15min (262.5mL can be pumped during this 1h15min interval, which is sufficient to transfer the 200mL)	3.00-4.15	4.00 - 5.15 12.00 - 13.15 20.00 - 21.15
Final colon region – Waste	3,5 mL/min during 1h15min (262.5mL can be pumped during this 1h15min interval, which is sufficient to transfer the 200mL)	3.00-4.15	4.00 - 5.15 12.00 - 13.15 20.00 - 21.15

Dlaczego interwały? Dlaczego takie?

1. Możliwość sprawdzenia całego cyklu podczas jednego dnia roboczego
2. Zapobiegają przepompowaniu zbyt dużej ilości gazu z układu – zapobieganie zapowietrzeniu
3. Brak działań zaraz po północy (restart zegara SHIME = strata czasu, w przypadku paury systemu)

Conventional adult SHIME setup:



Average hydraulic retention times (based on influx and fixed volumes in each compartment):

- Colon ascendens = $500\text{mL} / (600\text{mL}/24\text{h}) = 20\text{h}$
- Colon transversum = $800\text{mL} / (600\text{mL}/24\text{h}) = 32\text{h}$
- Colon descendens = $600\text{mL} / (600\text{mL}/24\text{h}) = 24\text{h}$

Calculation of average hydraulic retention times can be done as described below. This does not depend on the exact pump speeds or length of time intervals, but only depends on the total influx and total volume of each vessel. The particular example given below is for a conventional adult SHIME:

TIM-1

TIM-1 składa się z przedziału żołądkowego i trzech przedziałów jelita cienkiego, reprezentujących dwunastnicę, jelito czcze i jelito kręte.

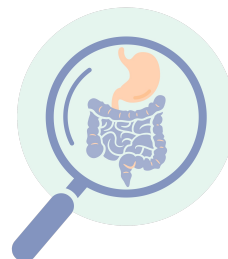
Roztwory żółci i trzustki są wydzielane z rzeczywistą prędkością przepływu, co skutkuje fizjologicznymi stężeniami w świetle.

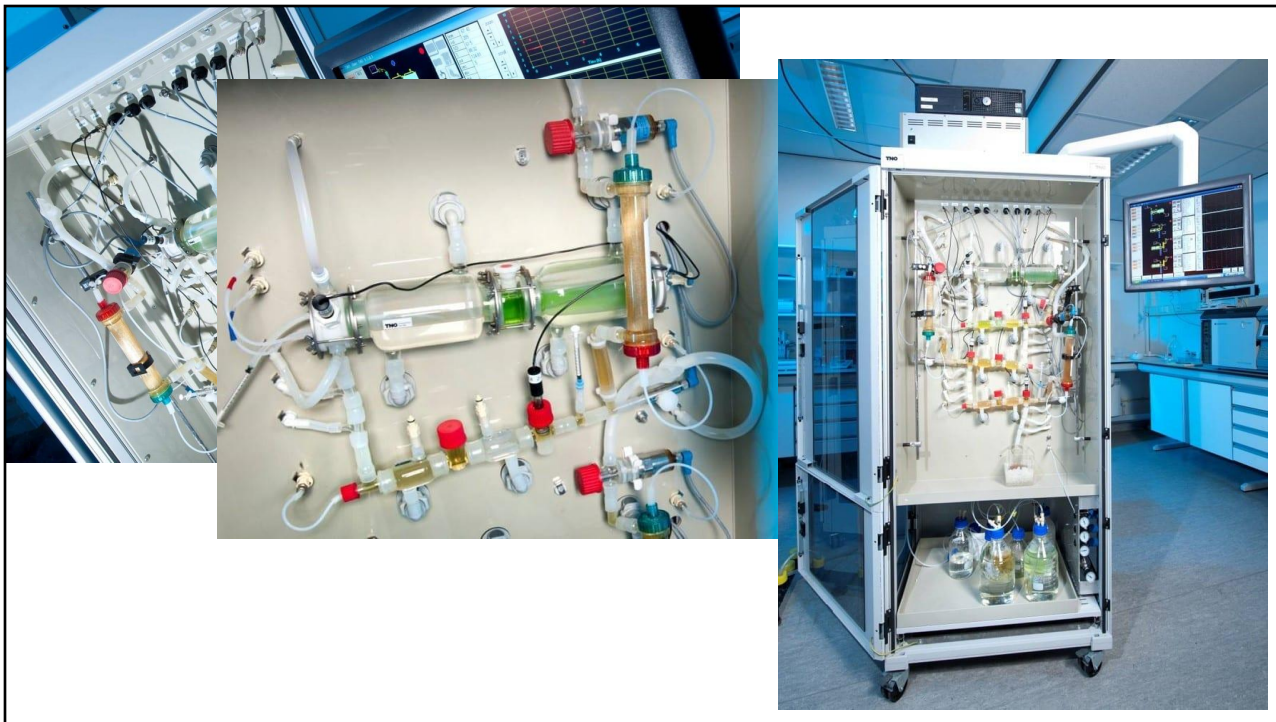
Wodny roztwór kwasu solnego (HCl) lub wodny roztwór wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) jest dodawany w celu kontrolowania odpowiednio pH żołądka lub jelit.

Zawartość jelita cienkiego jest mieszana za pomocą ruchów perystaltycznych i przepłukiwana przez membranę z pustych włókien w celu usunięcia frakcji biodostępnej. Rodzaj membrany z pustych włókien można wybrać w oparciu o badane związki.

Moduł dializacyjny jest używany do usuwania związków rozpuszczalnych w wodzie ze światła jelita, podczas gdy jednostka filtrująca jest używana do usuwania mieszanych miceli, które zawierają związki lipofilowe (np. kwasy tłuszczowe i lipofilowe składniki odżywcze i/lub farmaceutyczne).

Ruchy perystaltyczne są dokładnie kontrolowane (i utrzymywane w temperaturze ciała) poprzez modulowanie ciśnienia cyrkulacji wody w przestrzeni między elastyczną ścianą a szklanym płaszczem. Maksymalne ciśnienie jest kontrolowane przez czujniki obecne w obiegu wody.





TIM-1

Przedziały żołądka i dwunastnicy są połączone zaworem perystaltycznym. TIM-1 ściśle symuluje kolejne dynamiczne warunki w górnym odcinku przewodu pokarmowego, takie jak temperatura ciała, krzywe pH, stężenia elektrolitów, enzymów i soli żółciowych oraz tranzyt pokarmu lub wody przez przewód pokarmowy, związane z warunkami żołądkowo-jelitowymi dorosłych, noworodków (0-1 miesiąc życia), niemowląt (1-6 miesięcy), małych dzieci (6-24 miesięcy) lub osób starszych.

Wartości zadane symulacji żołądkowo-jelitowej są kontrolowane i monitorowane przez specjalne programy komputerowe.

Podczas eksperymentów uwolniony i rozpuszczony związek będący przedmiotem zainteresowania jest usuwany przez półprzepuszczalną membranę połączoną z przedziałami jelita czczego i krętego. Umożliwia to pobieranie próbek podczas tranzytu żołądkowo-jelitowego i ocenę frakcji biodostępnej. Jest to frakcja związku, która jest potencjalnie dostępna do wchłaniania w jelicie cienkim. Niewchłonięta frakcja, która zostałaby dostarczona do jelita grubego, jest zbierana jako ściek z jelita krętego po przejściu przez symulowaną zastawkę krętniczo-kątniczą.

Dodatkowo, próbki luminalne mogą być pobierane z przedziałów jelita czczego i krętego.

tinyTIM

System tiny-TIMsg składa się z zaawansowanego przedziału żołądkowego (TIMagc), który umożliwia realistyczną symulację morfologii i motoryki żołądka. Jest to szczególnie interesujące, gdy zachowanie badanych związków w żołądku, takie jak separacja faz i zależne od fazy opróżnianie żołądka, są ważnymi celami badań lub pytaniami badawczymi.

TIMagc umożliwia badanie zachowania postaci dawki w warunkach realistycznych sił ścinających i ciśnieniowych w żołądku oraz ich interakcji z rzeczywistymi posiłkami. Szybkości ścinania obserwowane w TIMagc są zależne od czasu, które są charakterystyczne dla ludzkiej motoryki żołądka, a zatem bardziej istotne fizjologicznie niż stałe szybkości ścinania obserwowane w konwencjonalnym USP II.



[Gastroenterology](#). Author manuscript; available in PMC 2022 Jan 1.

Published in final edited form as:

[Gastroenterology](#). 2021 Jan; 160(2): 495–506.

Published online 2020 Dec 8. doi: [10.1053/j.gastro.2020.08.065](#)

PMCID: PMC8714606

NIHMSID: NIHMS1764068

PMID: [33307032](#)

Author Manuscript

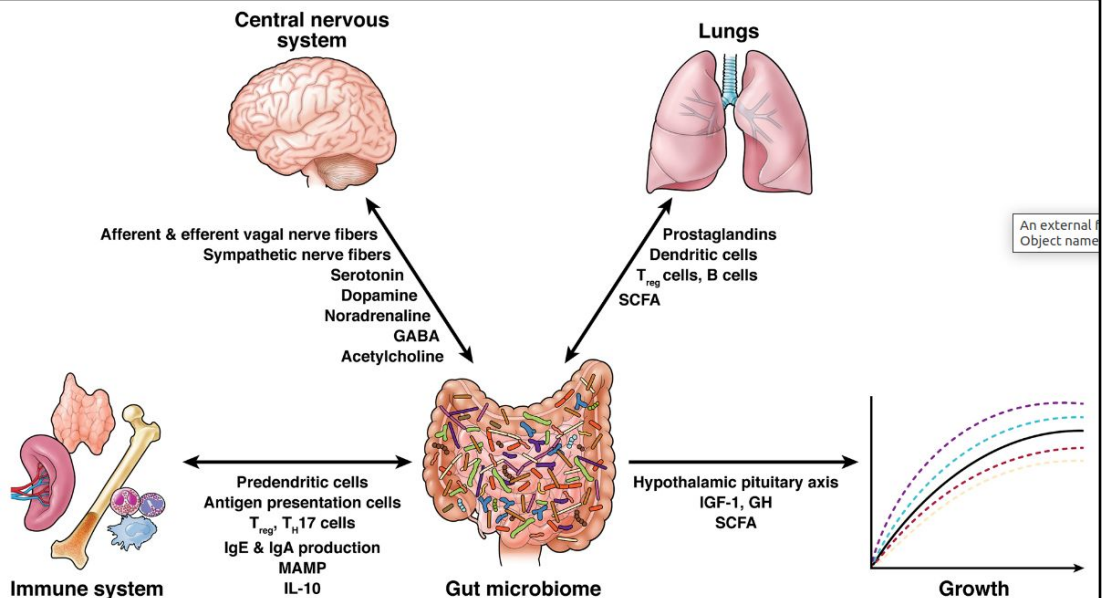
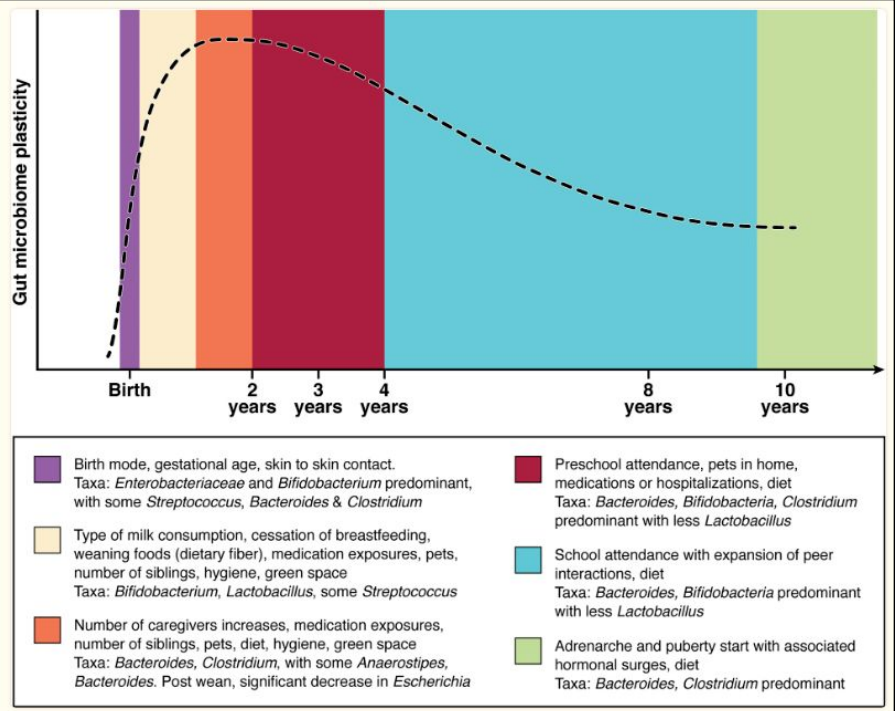
Childhood Development and the Microbiome: The Intestinal Microbiota in Maintenance of Health and Development of Disease During Childhood Development

Victoria Ronan,¹ Rummanu Yeasin,^{1,2} and Erika C. Claud^{1,*}

► Author information ► Copyright and License information ► [PMC Disclaimer](#)

Skład mikrobiomu jelitowego wpływa na zdrowie od okresu prenatalnego przez całe dzieciństwo, a wiele chorób wiąże się z dysbiozą. Mikrobiom jelitowy ulega ciągłym zmianom, od urodzenia do dorosłości, a na jego rozwój i zawartość wpływa kilka czynników. Cechy mikrobioty jelitowej mogą wpływać na rozwój mózgu, układu odpornościowego i płuc, a także na wzrost ciała. Dokonujemy przeglądu rozwoju mikrobiomu jelitowego, zwolenników dysbiozy i interakcji mikrobioty z innymi narządami. Mikrobiom jelitowy należy traktować jako układ narządów, który ma istotny wpływ na rozwój dziecka. Dysbioza została powiązana z chorobami u dzieci i dorosłych, w tym z autyzmem, zespołem nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, astmą i alergiami.

Słowa kluczowe: mikrobiom jelitowy, rozwój dziecka, mikrobiota, niemowlęstwo, choroby



Proposed mechanisms of bi- and uni-directional communication from gut microbiome to various organ systems impacting child health and disease

While the exact mechanisms of communication are yet to be understood, these are the most commonly hypothesized pathways. Communication can occur along nerve fibers, hormonal axes and via mediation of many different cytokines, bioactive amines, microbe-associated molecular patterns (MAMP) and short chain fatty acids.

INFOGEST

Rozwijanie mechanistycznego zrozumienia wpływu struktury i składu żywności na zdrowie człowieka w coraz większym stopniu obejmuje symulację trawienia w górnym odcinku przewodu pokarmowego. Symulacje te wykorzystują szeroki zakres różnych warunków, które często mają bardzo małe znaczenie fizjologiczne, co utrudnia znaczące porównanie wyników.

COST INFOGEST.
Metoda została zaprojektowana do stosowania ze standardowym sprzętem laboratoryjnym i wymaga ograniczonego doświadczenia, aby zachęcić szerokie grono badaczy do jej stosowania.

Jest to statyczna metoda trawienia, która wykorzystuje stale proporcje masek do płynów trawiennych i stałe pH dla każdego etapu trawienia. To sprawia, że metoda jest prosta w użyciu, ale nie odpowiednia do symulacji kinetyki trawienia. Korzystając z tej metody, próbki żywności są poddawane sekwencyjnemu trawieniu doustnemu, żołądkowemu i jelitowemu trawieniu w żołądku i jelitach, podczas gdy parametry takie jak elektrolity, enzymy, żółć, rozcieńczenie, pH i czas trawienia są oparte na dostępne dane fizjologiczne.

Metoda ta może być stosowana do oceny punktów końcowych wynikających z trawienia żywności poprzez analizę produktów trawienia (np. peptydów/aminokwasów, peptydów/aminokwasów, kwasy tłuszczowe, cukry proste) i ocenę uwalniania mikrośladków odżywczych z matrycy żywności.

Cały protokół może być zakończony w ciągu ~7 dni, w tym ~5 dni wymaganych do określenia aktywności enzymów.

5 d		Preparation	• Perform enzyme activity and bile assays	Step 1
			• Prepare SSF, SGF and SIF stock solutions	2
			• Perform pH-test adjustment experiment	4
1 d		Oral phase	• Mix Food with SSF (1:1, (wt/wt))	7-12
			• Include CaCl ₂ (1.5 mM in SSF)	13
			• Add salivary amylase, if necessary (75 U/mL)	14
			• Incubate while mixing (2 min, 37 °C, pH 7)	15, 16
		Gastric phase	• Mix oral bolus with SGF (1:1 (vol/vol))	17, 18
			• Include CaCl ₂ (0.15 mM in SGF)	19
			• Add pepsin, gastric lipase (2,000, 60 U/mL)	20, 21
			• Incubate while mixing (2 h, 37 °C, pH 3.0)	22-24
		Intestinal phase	• Mix gastric chyme with SIF (1:1 (vol/vol))	25, 26
			• Include bile (10 mM bile salts)	27
			• Include CaCl ₂ (0.6 mM in SIF)	28
			• Add pancreatin (trypsin activity 100 U/mL)	29
			• Incubate while mixing (2 h, 37 °C, pH 7.0)	30-32
		Sampling	Sampling procedure and sample treatment (Table 1)	

SSF Simulated salivary fluid

SGF Simulated gastric fluid

SIF Simulated intestinal fluid

Pepsin activity assay

Principle: hemoglobin plus H₂O produces TCA-soluble tyrosine peptides when pepsin is applied.

Unit definition: one unit produces a ΔA280 of 0.001 per min at pH 2.0 and 37 °C, measured as TCA-soluble products.

Substrate: 2% (wt/vol) hemoglobin in water at pH 2.

Enzyme solution: pepsin in 10 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, pH 6.5. Before the assay, dilute it in 10 mM HCl at concentrations ranging from 5 to 30 μg/mL.

Mix 500 μL of hemoglobin with 100 μL of each pepsin solution (5-30 μg/mL) and incubate for 10 min at 37 °C.

To stop the reaction, add 100 μL of 10% TCA.

read the absorbance at 280 nm.

Lipase activity assay

Principle: tributyrin plus H₂O produces butyric acid and sn-2 monobutyrin when lipase is applied.

Unit definition: one unit releases 1 μmol of butyric acid per min at 37 °C at the pH of the assay.

Substrate: tributyrin purity ≥99%.

Enzyme :

Assay sc

Assay so

In a pH-s

water en

maintain

Trypsin activity assay

Principle: TAME plus H₂O produces p-toluene-sulfonyl-L-arginine plus methanol when trypsin is applied.

Unit definition: One unit hydrolyzes 1 μmol of p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) per min at pH 8.1 and 25 °C.

Substrate: 10 mM TAME in H₂O.

Amylase activity assay

Principle: Starch plus H₂O produces reducing groups (e.g., maltose) when α-amylase is applied.

Unit definition: One unit releases 1.0 mg of maltose equivalent from starch in 3 min at pH 6.9 and 20 °C.

Substrate: 1.0 % (wt/vol) soluble potato starch in 20 mM sodium phosphate buffer with 6.7 mM NaCl, adjusted to pH 6.9.

Enzyme solution: 1 mg/mL amylase in H₂O.

Incubate 1 mL of substrate at 20 °C, add the enzyme solution (0.5-1 mL, with an estimated activity of 1 unit/mL) and incubate at 20 °C for 3 min. Stop the reaction with a color reagent (96 mM 3,5-dinitrosalicylic acid, 5.3 M sodium potassium tartrate). Bring the volume to 1 mL with H₂O, cap the tube and boil for 15 min. Add 9 mL of H₂O and read the absorbance at 540 nm. Calculate the activity against a maltose standard curve.



Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins

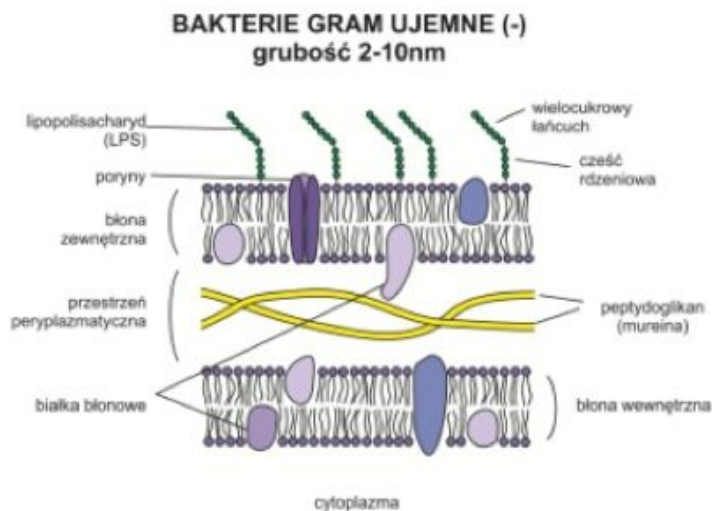
Lisa Ann Burdette^{1,4}, Samuel Alexander Leach², Han Teng Wong^{3,4} and Danielle Tullman-Ercek^{2*}

Abstract

Gram-negative bacteria are attractive hosts for recombinant protein production because they are fast growing, easy to manipulate, and genetically stable in large cultures. However, the utility of these microbes would expand if they also could secrete the product at commercial scales. Secretion of biotechnologically relevant proteins into the extracellular medium increases product purity from cell culture, decreases downstream processing requirements, and reduces overall cost. Thus, researchers are devoting significant attention to engineering Gram-negative bacteria to secrete recombinant proteins to the extracellular medium. Secretion from these bacteria operates through highly specialized systems, which are able to translocate proteins from the cytosol to the extracellular medium in either one or two steps. Building on past successes, researchers continue to increase the secretion efficiency and titer through these systems in an effort to make them viable for industrial production. Efforts include modifying the secretion tags required for recombinant protein secretion, developing methods to screen or select rapidly for clones with higher titer or efficiency, and improving reliability and robustness of high titer secretion through genetic manipulations. An additional focus is the expression of secretion machineries from pathogenic bacteria in the "workhorse" of biotechnology, *Escherichia coli*, to reduce handling of pathogenic strains. This review will cover recent advances toward the development of high-expressing, high-secreting Gram-negative production strains.

Keywords: Protein secretion, Bacterial secretion systems, Recombinant protein

Sekrecja u bakterii gram-ujemnych



Typy sekrecji

• Typ I

- | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|--------------|------------------|---------|--------------|--------------|----------------------------|
| Sekrecja i Olf. z wewnątrzkomórkowej | Sec-niezależna, pominięciem | To perłazmy. | transport Białko | biorące | białka w nim | przez udział | IM: ABC. Protein. Protein. |
| -białko | MFP | (ang.) | exporter | | | | |
| -białko | OMP | (ang.) | Membrane Outer | | | | |
| | | | | | | | |
| Twory one kanał, przez który zostaje wydzielone białko, zakończeniu sekrecji struktura kanału rozpada się. | | | | | | | |

• Typ II

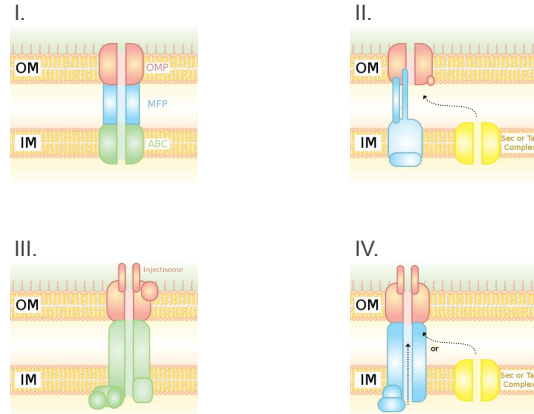
- * Sekrecja Sec-zależna. To dwuetapowy proces, najpierw następuje transport białek przez IM za pomocą systemu Sec, następnie następuje przejście białka poprzez OM przez sekreton-kompleks zakotwiczony w obu błonach, utworzony z 12-15 białek. To typ sekrecji białek w pełni złożonych.

• Typ III

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

• Typ IV

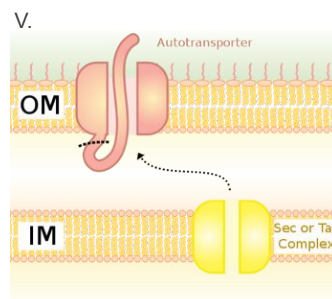
- Sekrecja Sec-zależna. Ten typ służy do wydzielania białek (dwuetapowo) oraz translokacji cząsteczek DNA (jednoetapowo) do komórek gospodarza. Przeniesienie białek do komórki zainfekowanej umożliwia białkowa struktura-pila.



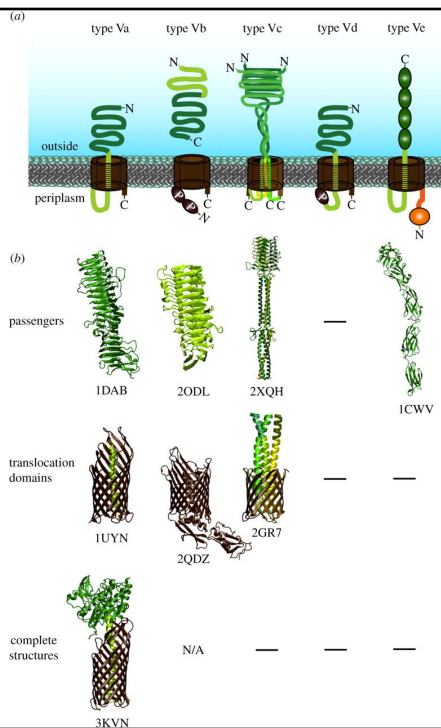
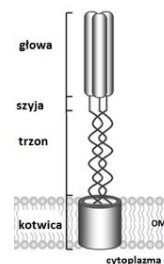
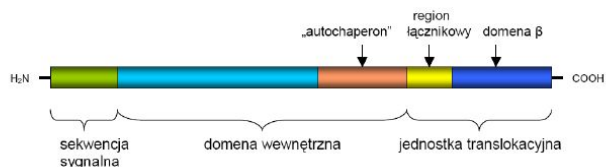
Typ V - autotransportery

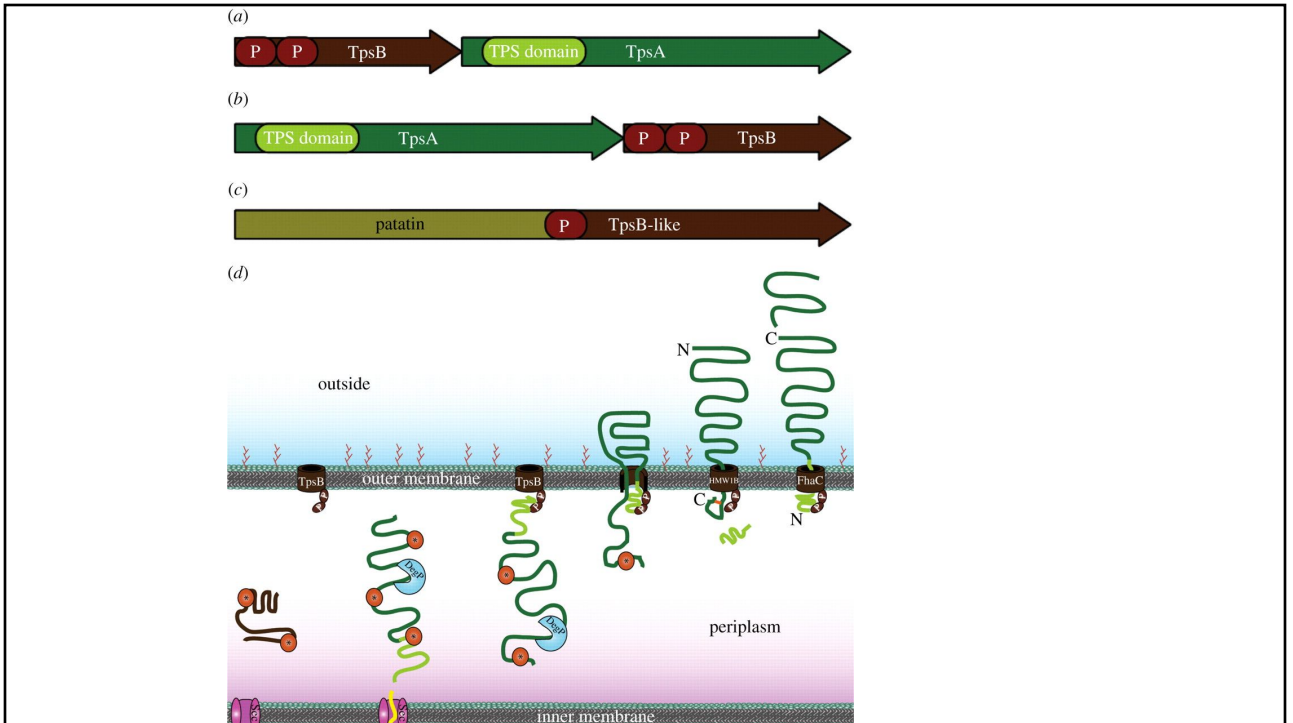
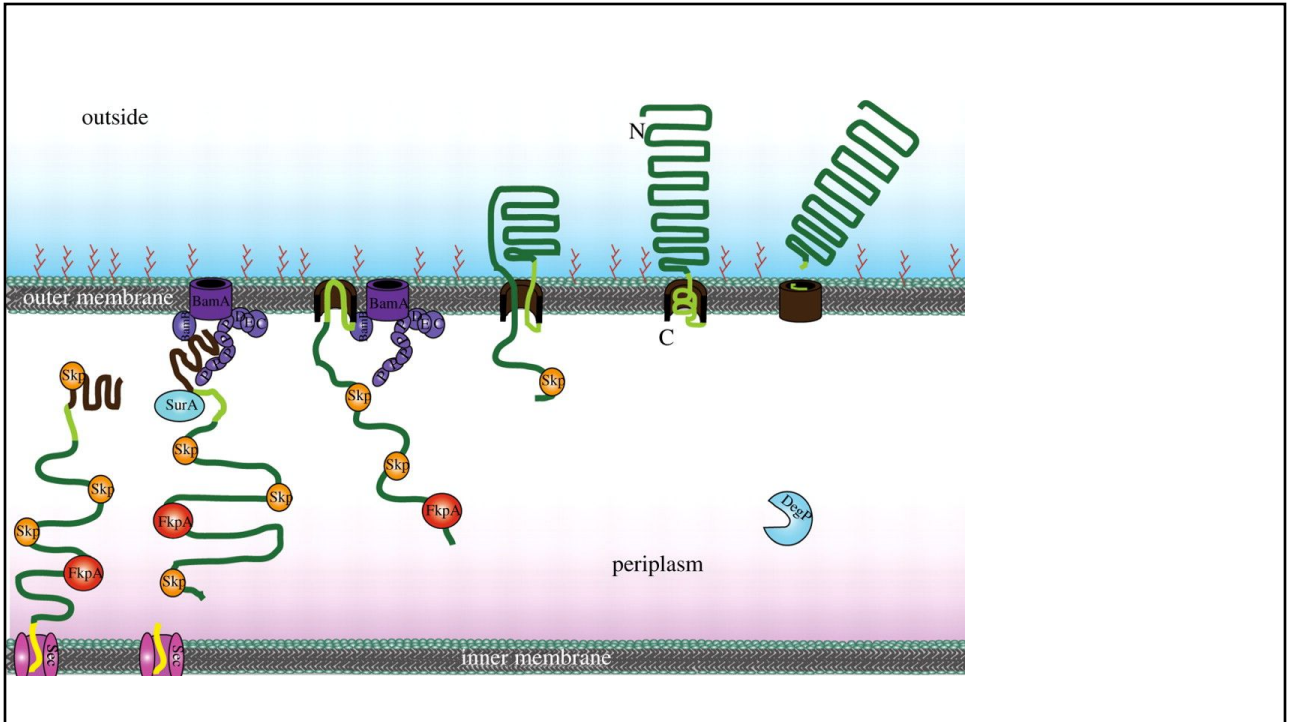
• Typ V

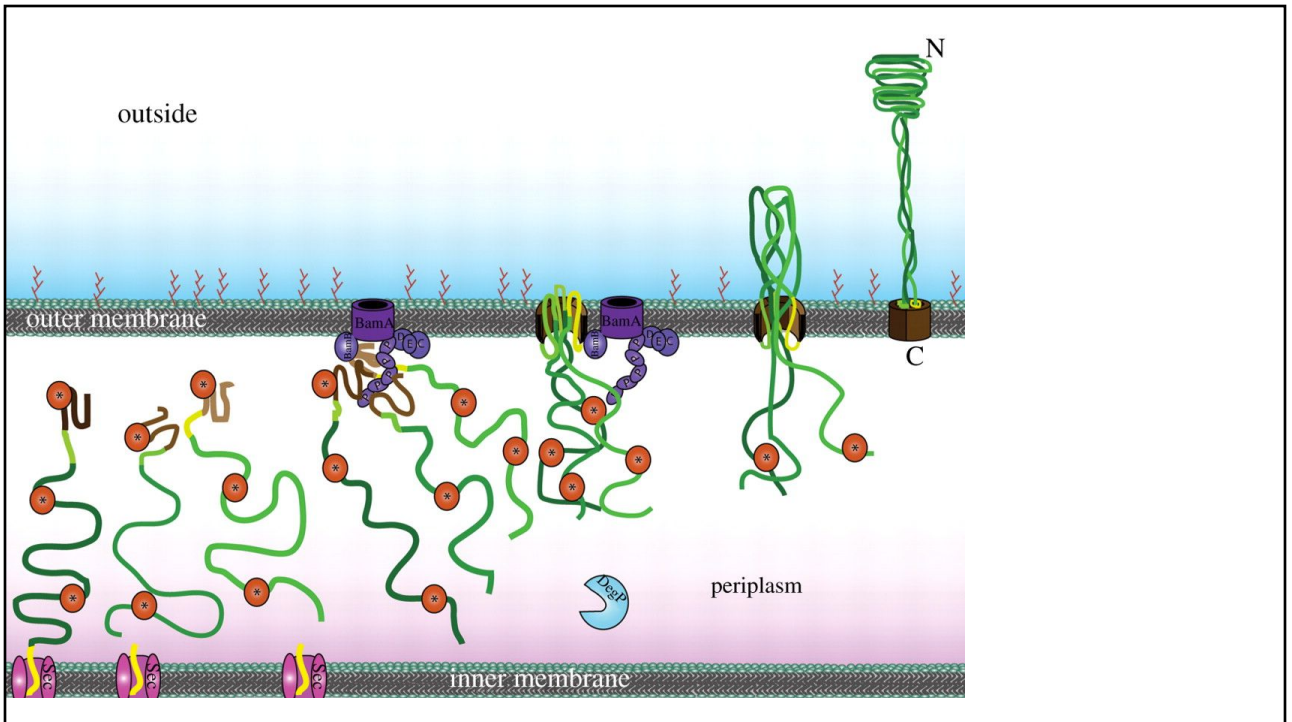
- Autotransportery to białka, które nie potrzebują do sekcji białek z perłymiż dodatkowego aparatu.
- Autotransporter składa się z:
 - N-terminalnej sekwencji białkowej,
 - domeny C-terminalnej,
 - wewnętrznej domeny funkcjonalnej.
- Mechanizm autotransportu nie wymaga dostarczenia energii z zewnątrz.



Typ V - autotransportery







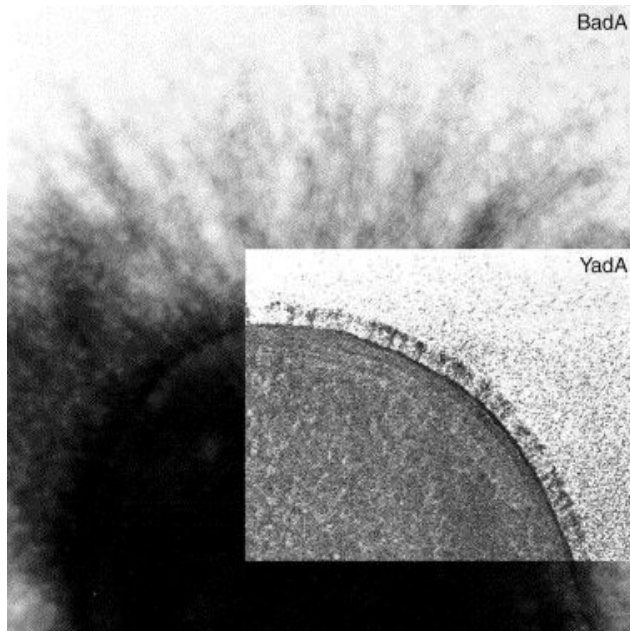
YadA prototypowy TAA (Trimeric Autotransporter Adhesin)

• 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 rozniosły ją pasożytyujące 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 ogólnoświatowej liczebności ludzkiej styl do poprawy] z 450 milionów do 350–375 milionów w XIV wieku.

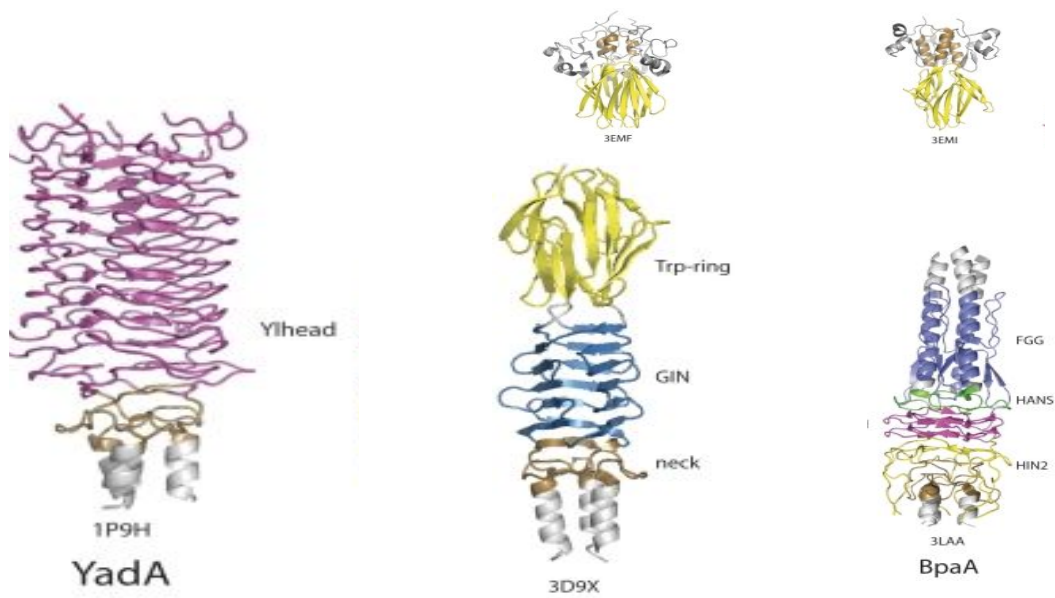
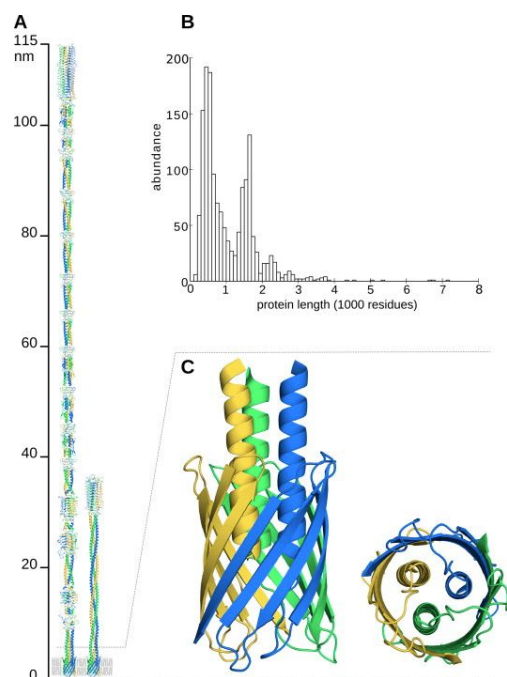


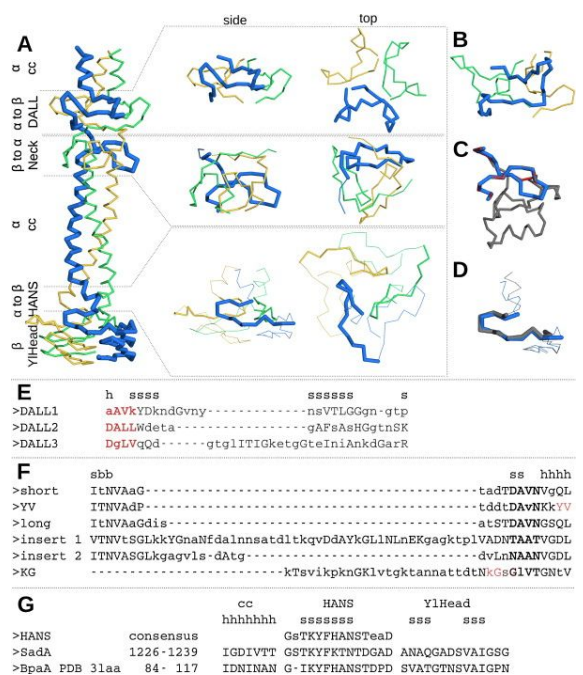
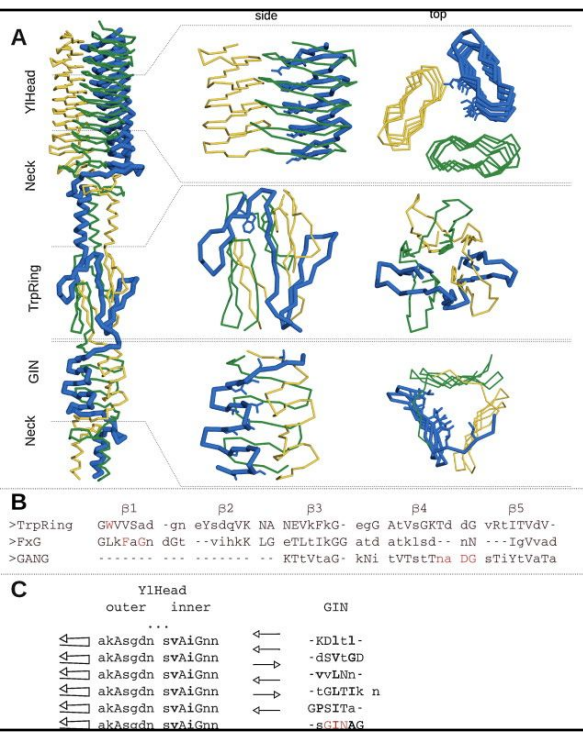


YadA

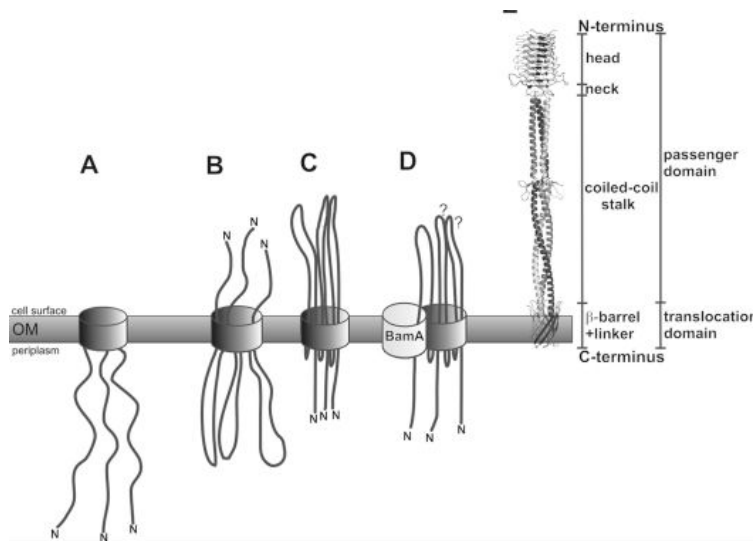
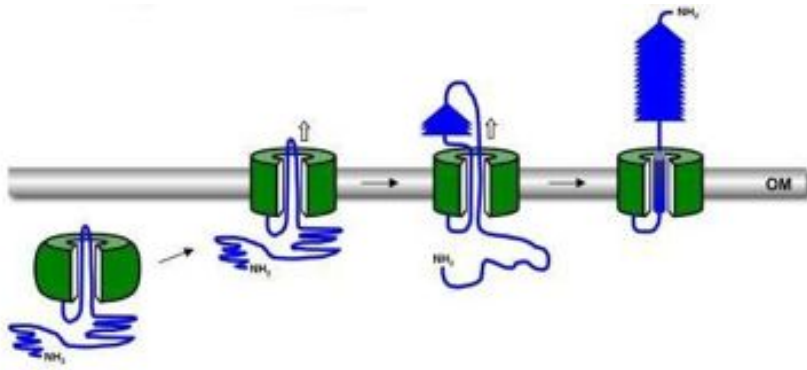
- Należy do białek adhezyjnych.
- Za jego pomocą bakteria po przejściu przez błonę śluzową jelita przymocowuje się do powierzchni i infekuje organizm.
- Wiąże się z kolagenem, laminą i fibronektyną.





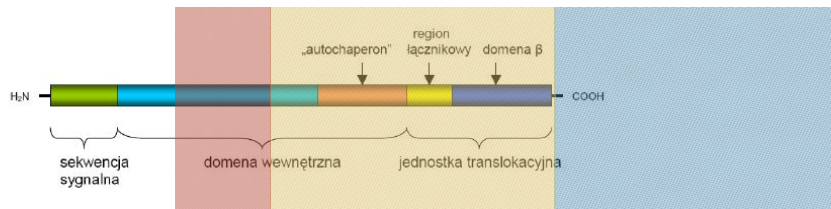


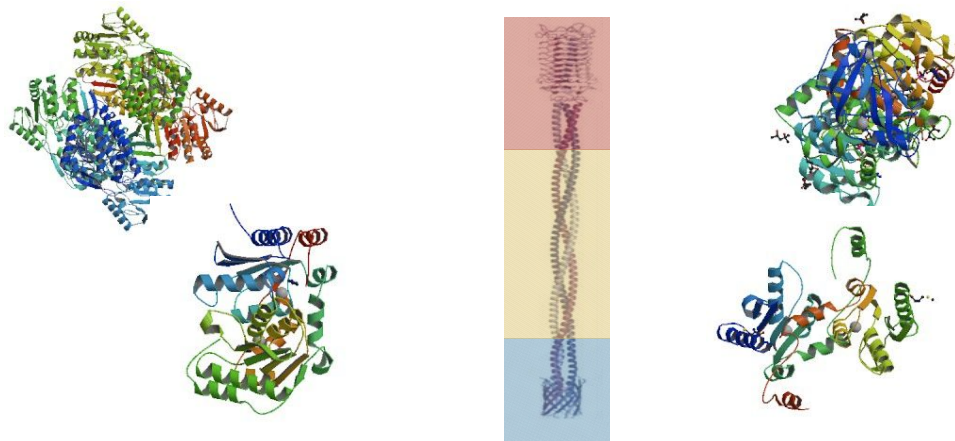
Typ V - autotransportery mechanism



Bacterial display

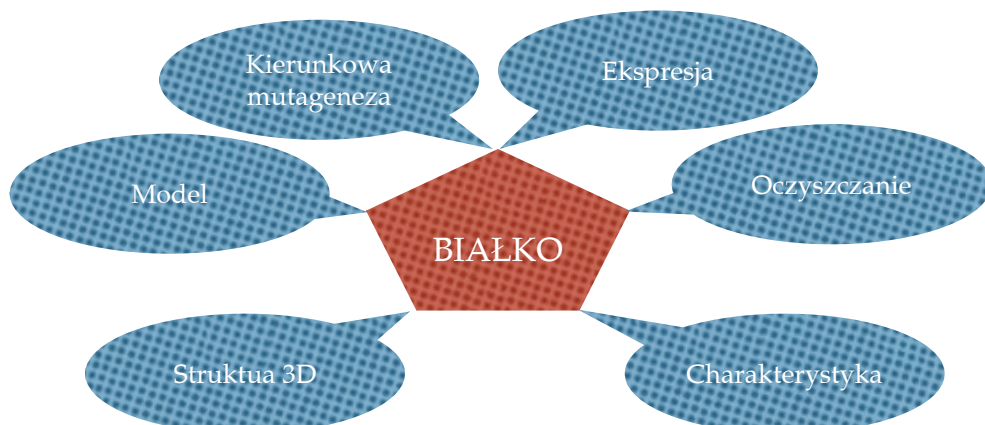
- Technika pozwalająca na umieszczenie na powierzchni bakterii bibliotek peptydów.
- W zamyśle technika pozwala na powiązanie funkcji białka z genem je kodującym.
- Wykorzystywana do:
 - identyfikację powinowactwa
 - mapowania epitopów przeciwciał
 - identyfikację substratów
 - dostarczania szczepionek





Podjęcie klasyczne...

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



Podejście współczesne...

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

In-vivo

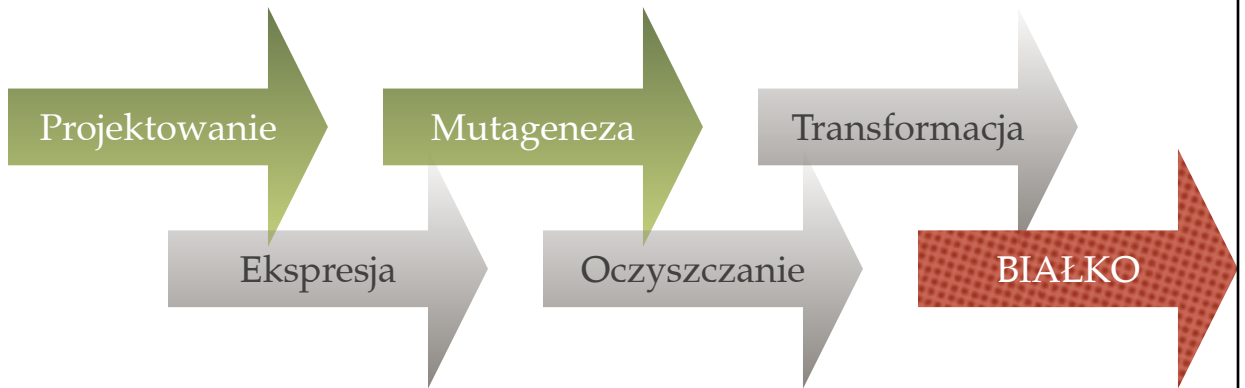
In-silico

In-vitro

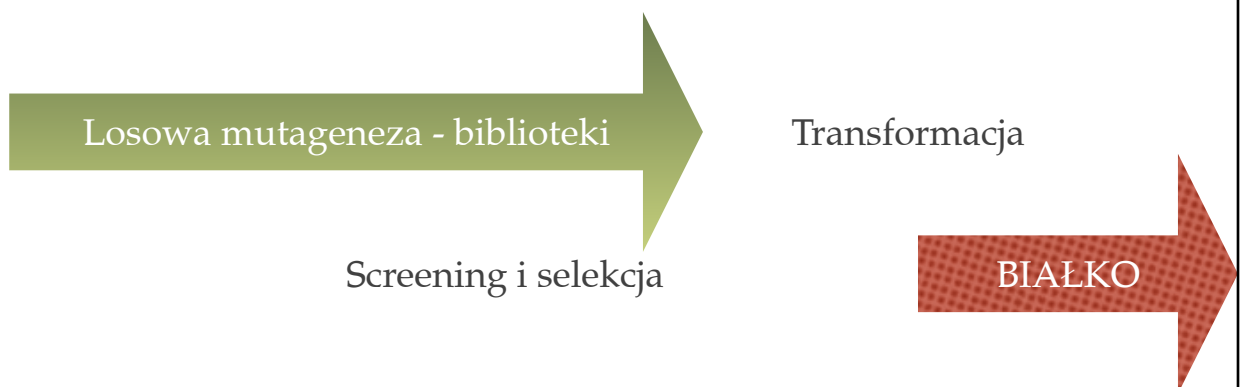
Możliwości...

- 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
 - wielodomenowych białek
 - opornych na hydrolizę
 - słabo rozpuszczalnych
 - mieszaniny sfaldowanych / lokalnie niesfaldowanych / niesfaldowanych
- 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:

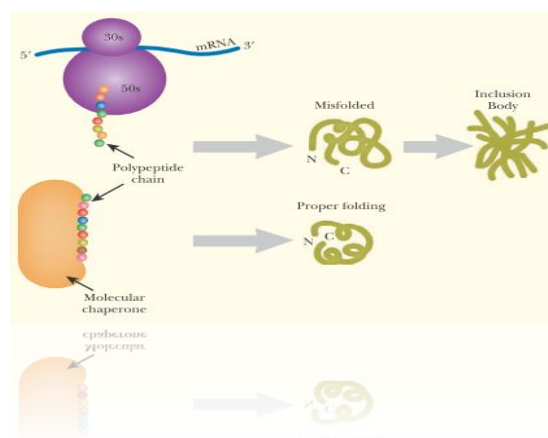
- (Met, Gly, Ala, Leu, Phe, Lys, itp) aminokwas N-końcowy (itp długie życie);
- sekwencje *PEST* destabilizujące – sekwencje 10-60 AA w środku białka bogate w Pro, Glu, Ser i Thr – one są rozpoznawane przez enzymy proteolityczne
- najprościej zmienić aminokwas N-końcowy – wystarczy go dodać np. w trakcie 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

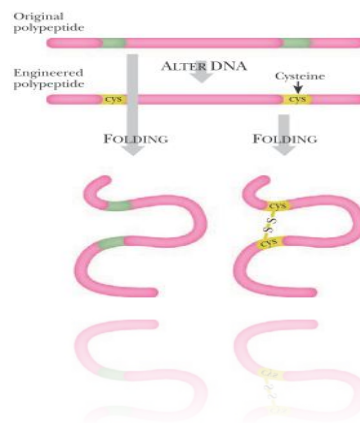
Poprawianie stabilności

- 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



20

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

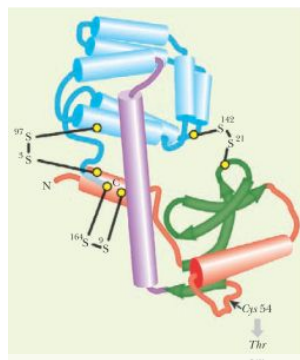


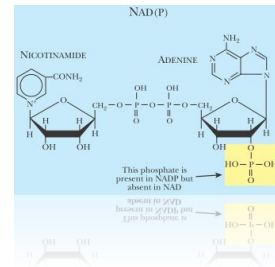
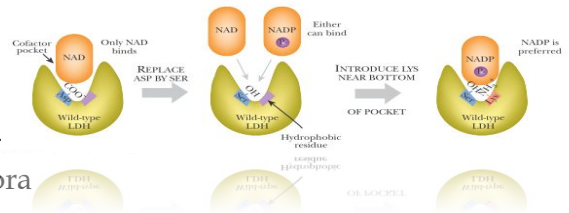
Table 11.2 Disulfide Stabilization of T4 Lysozyme

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

20

Miejsce aktywne

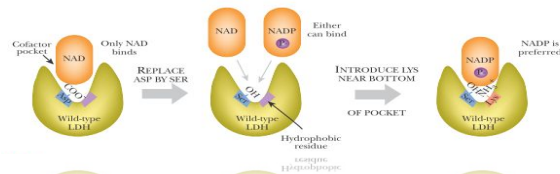
- można zmienić także miejsce aktywne enzymu specyficzność wiązania substratu albo kofaktora
- przykład enzymy z grupy dehydrogenaz, które mają kofaktory NAD lub NADP – mają podobny mechanizm, ale NAD jest używany przez enzymy szlaków degradacji i w łańcuchu oddechowym, natomiast NADP w reakcjach syntezy
- 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.



20

6

Miejsce aktywne



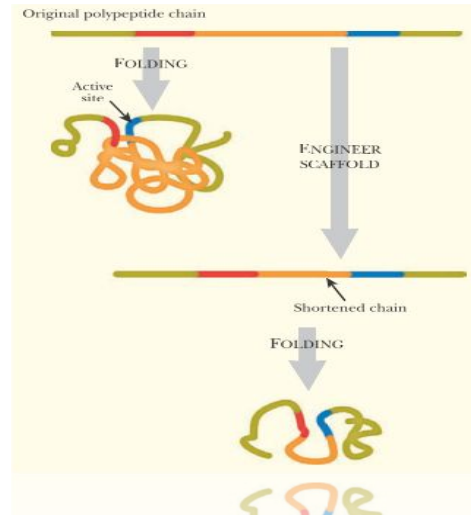
- dehydrogenaza mleczanowa większości bakterii używa NAD ale nie NADP, w reakcji przekształcania pirogronianu w mleczan
- w miejscu wiązania kofaktora znajduje się ujemnie naładowany asparaginian (co wyklucza wiązanie NADP) – jeżeli zamieni się go na obojętny (np Ser) enzym będzie mógł wiązać oba kofaktory. 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 łańcuchy mogą być substratami

20

7

Zmiana architektury

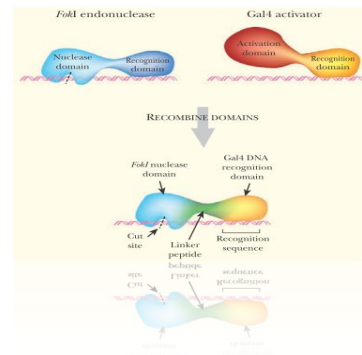
- w enzymach miejsce aktywne buduje stosunkowo niewiele AA
- pozostałe stanowią trójwymiarowe rusztowanie odpowiedzialne za to, żeby odpowiednie reszty znalazły się w odpowiednim miejscu w przestrzeni
- bardzo często takie rusztowanie jest znacznie większe niż trzeba – np. β galaktozydaza z *E. coli* 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



20

Rekombinacja domen

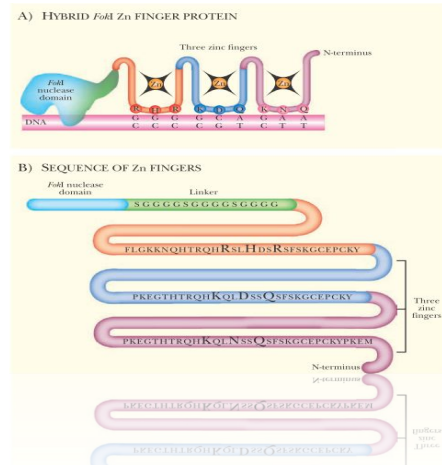
- łączy się domeny funkcjonalne z różnych białek
- enzymy restrykcyjne - połączenie domeny tnącej Fok I z inną sekwencyjnie specyficzną domeną wiążącą DNA. Fok I jest enzymem restrykcyjnym II typu z domenami N końcową (rozpoznawanie sekwencji DNA) i C końcową (cięcie DNA). Sama domena endonukleazowa tnie niespecyficznie, ale jeżeli połączy się ją z domeną rozpoznającą sekwencję, to ona będzie determinować specyficzność cięcia 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



20

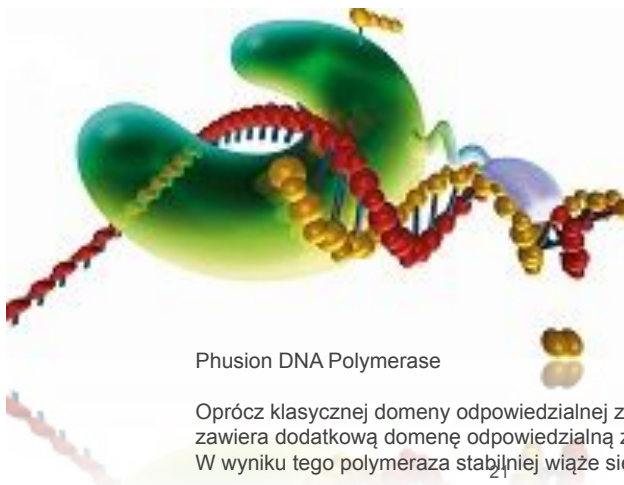
Rekombinacja domen

- 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 specyficznie 9 pz połączona z domeną nukleazową Fok I



21

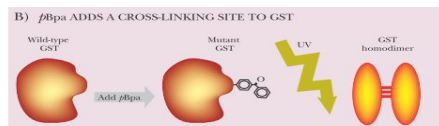
Rekombinacja domen



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 szablonem.

Modyfikacja AA



- nienaturalne aminokwasy mają wiele różnych grup, np p-benzoilo-L-fenylalaniny 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

21

2

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

21

2

INSULINA

LEK CORAZ BARDZIEJ
DOSKONAŁY

Insulina dziś ≠ Insulina 100 lat temu

POCZĄTKI LECZENIA INSULINĄ:

- × Insulina pozyskiwana była z trzustek zwierząt
- × Lek był słabo oczyszczony
- × Często pojawiały się powikłania skórne
- × Lek był niewystandaryzowany (nie zawsze działał z taką samą siłą)
- × Zastrzyki były bolesne
- × 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 &   

Historia odkrycia

Do 1921

Cukrzyca chorobą śmiertelną. Brak leku.

1889 – identyfikacja trzustki jako źródła problemu (Oskar Minkowski, Josep von Mering).

1910 – Edward Albert Sharpey-Shafer wskazuje wysepki Langerhans'a jako wadliwą klasę komórek trzustki i insulinę jako (*łac. insula*) jako związek.

Historia odkrycia

1922 University of Toronto
Frederick Banting (Nobel 1923)
John Macleod (Nobel 1923)
Charles Best
James Collip



F. Banting & C. Best (1924)

Nobel 1958 Frederick Sanger – sekwencja AA
Nobel 1977 Rosalyn Sussman Yalow -
radioimmunologiczna detekcja insuliny
Nobel 1969 Dorothy Hodgkin – metody
krystalograficzne (struktura insuliny)

Pacjent 0

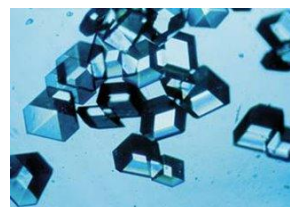
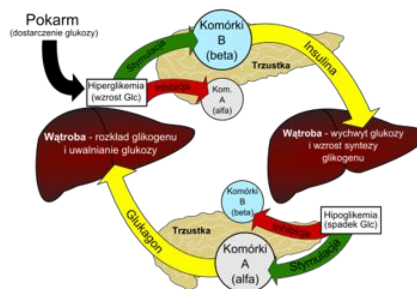
Leonard Thompson (14)

11 stycznia 1922

Ekstrakt z trzustek płodów cielęcych - reakcja
alergiczna.

23 stycznia 1922

'Doczyszczony' ekstrakt nie powoduje efektów
ubocznych.



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.

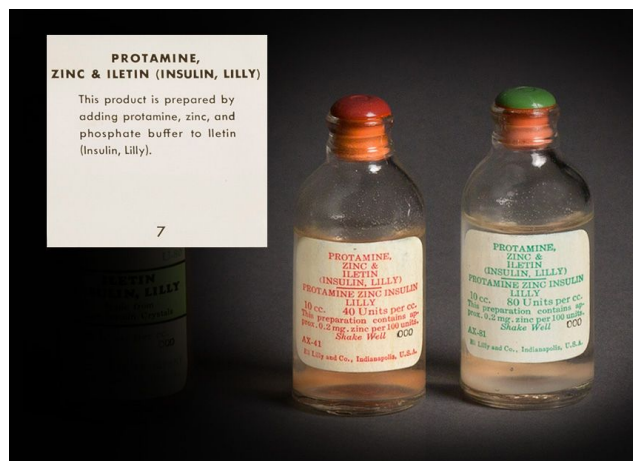
Po II wojnie światowej produkcja insuliny była kontynuowana przez Zjednoczenie Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed” w Warszawie.

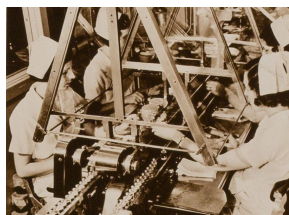
1953 produkcja w zakładach Polfy Tarchomin

Insulin sales kit, Eli Lilly and Company, 1940s









Bioton, Macierzysze pod Warszawą

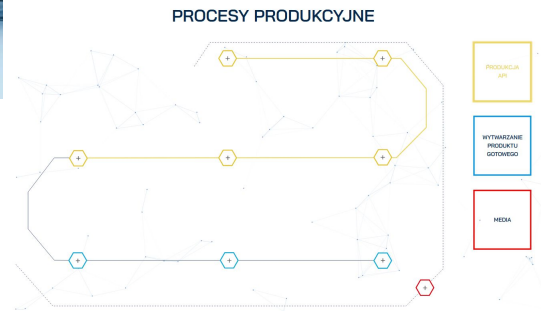


Bioton

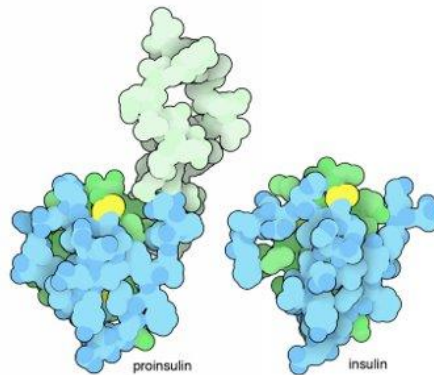
Fabryka BIOTON w Macierzyszu pod Warszawą to jeden z najnowocześniejszych zakładów biotechnologicznych na świecie. To w niej powstaje insulina – zarówno substancją czynną, jak i gotowe formy leku. BIOTON produkuje insulinę najwyższej jakości na skalę komercyjną, zapewniając pacjentom bezpieczne i skuteczne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

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

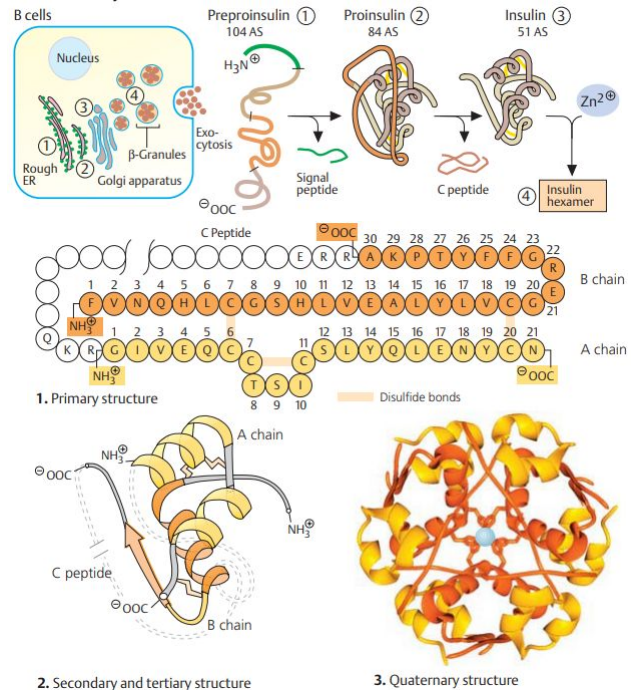
[Materiały prasowe]



Insulina



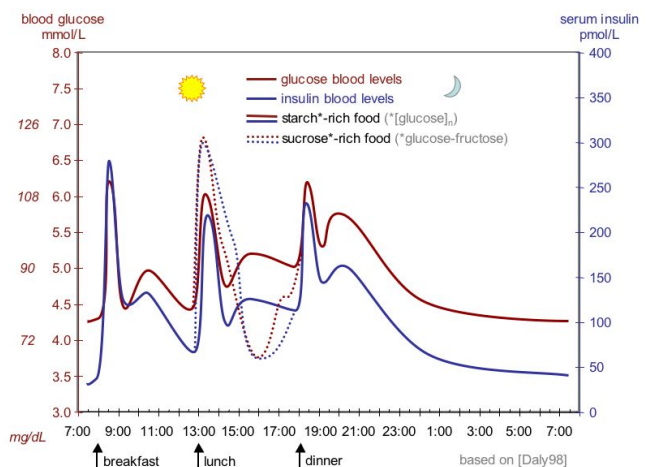
Insulina



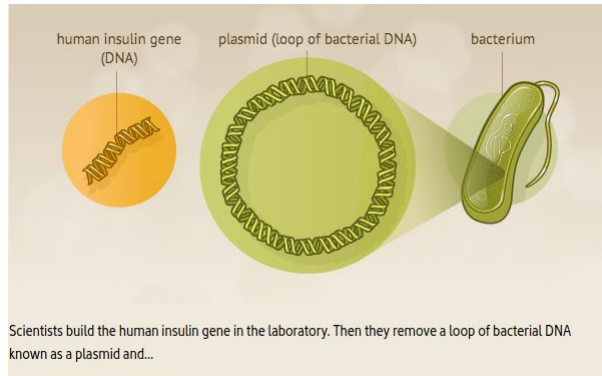
Insulina rekombinowana

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

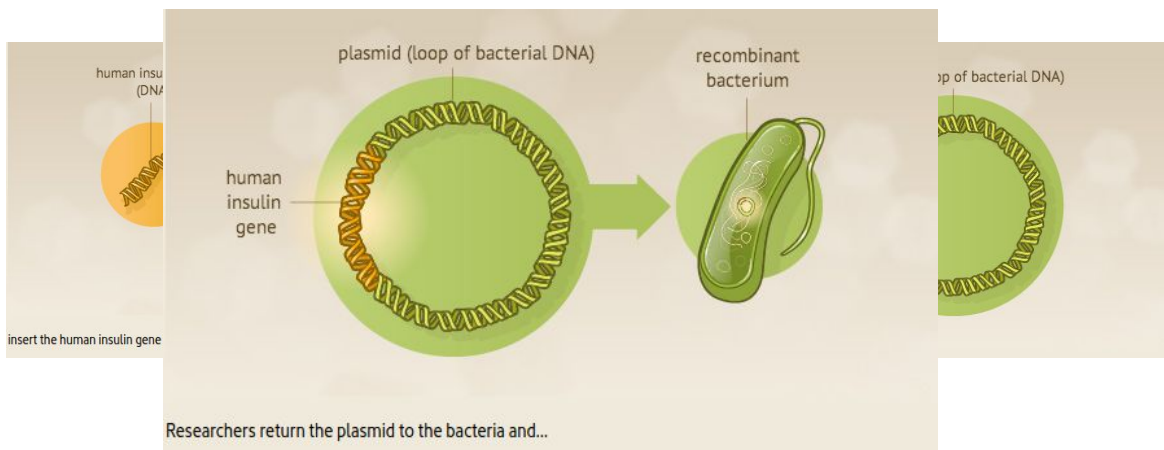
Od ludzkiej insuliny analogi różnią się strukturą chemiczną związku, która wpływa na właściwości farmakologiczne, przyspieszając lub zwalniając wchłanianie hormonu z tkanki podskórnej.



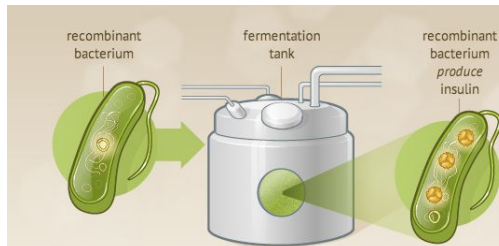
Insulina rekombinowana



Insulina rekombinowana



Insulina rekombinowana



There, the recombinant bacteria use the gene to begin producing human insulin.

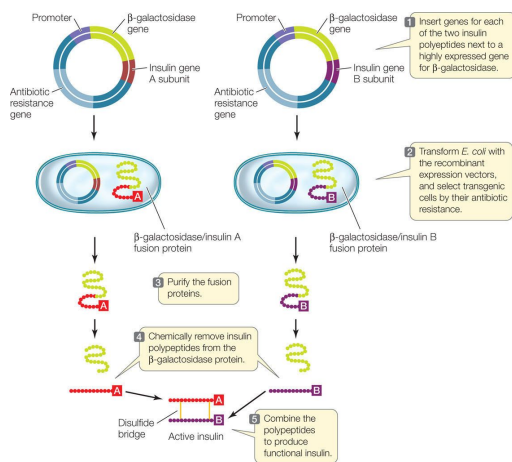


purify the substance for use as a medicine for people.

Insulina rekombinowana

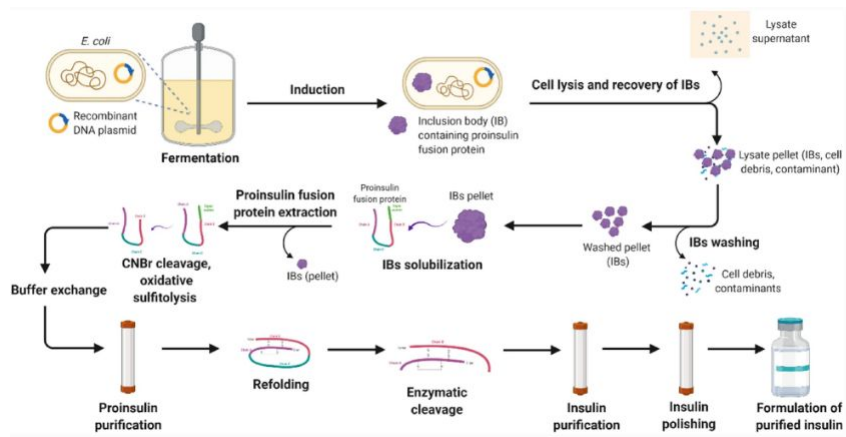
Hakura *et al.* (1977)

- Geny kodujące łańcuchy A i B umieszczone na oddzielnych plasmidach pBR322;
- *E. coli* jako organizm produkujący;
- Ekspresja pro-insulin połączonych z β -galaktozydazą;
- Usunięcie β -galaktozydazy.
- Rekonstrukcja funkcjonalnej insuliny.



13.12 David McInyre





Additives	Purification	Concentrations	Example references
EDTA	A metal chelator to inactivate metalloproteases (Bischoff 2012) Disrupts the lipopolysaccharide site of insertion into the bacterial outer membrane (Schneelman 1971)	0.5 mM	Mackin (2010)
		1 mM	Chen et al. (2010)
			Hwang et al. (2010)
			Nilsson et al. (1995)
		2 mM	Yuan et al. (2010)
Glycerol	NA		Leng et al. (2010)
			Tikhonov et al. (2003)
		5%	Mackin (2010)
		0.02%	Hwang et al. (2010)
			Kim et al. (2010)
Lysozyme	Cleaves the backbone of peptidoglycan (Hwang et al. 2010)		Son et al. (2009)
NaCl	Solubilizes impurity through ionic interaction (Bischoff 2012)	0.05 M	Mackin (2010)
		0.1 M	Leng et al. (2010)
		0.2 M	Nilsson et al. (1995)
		0.5 M	Mikiewicz et al. (2017)
			Yuan et al. (2010)
			Zielinski et al. (2010)
		NA	Zimmerman and Stokell (2010)
Tris-HCl	Removes membrane phospholipid and fragments (Singh et al. 2011, Palmer and Wingfield 2012) Facilitates dissociation of debris and soluble proteins from inclusion bodies (Petrides et al. 1995)	0.05%	Petrakis et al. (1995)
		1%	Chen et al. (2010)
			Hwang et al. (2010)
			Kim et al. (2010)
			Leng et al. (2010)
			Mikiewicz et al. (2017)
			Min et al. (2011)
			Son et al. (2009)
			Tikhonov et al. (2003)
			Zielinski et al. (2010)
Tween 20	Extracts the bacterial outer membrane components (Palmer and Wingfield 2012)	2%	Castellano-Serra et al. (1995)
			Cowley and Mackin (1997)
		NA	Zimmerman and Stokell (2010)
Urea	A chaotropic agent to extract the bacterial outer membrane components (Palmer and Wingfield 2012, Petrides et al. 1995)	0.05%	Nilsson et al. (1995)
			Zimmerman and Stokell (2010)
		NA	Zimmerman and Stokell (2010)
		0.5 M	Hwang et al. (2010)
			Kim et al. (2010)
		2 M	Chen et al. (2010)
			Cowley and Mackin (1997)
			Kim et al. (2010)
			Min et al. (2011)
			Son et al. (2009)
			Yuan et al. (2010)
		3 M	Tikhonov et al. (2003)
		4 M	Castellano-Serra et al. (1995)

Duration of oxidative sulfitolysis	Temp	pH	Sodium sulfite (A)	Sodium tetrathionate (B)	Molar ratio of (A): (B)	Solubilization agent	Suspension concentration during oxidative sulfitolysis (mg/mL)	References
40 min	37 °C	8.7	0.4 M	0.15 M	2.6:1	7.5 M urea	15–20	Tikhonov et al. (2001)
1–2 h	RTP	8.5–8.7	0.1 M	0.01 M ^a	10:1	7 M GdnHCl	NA	Patrick and Lagu (1992)
2–3 h	RTP	8.7	0.4 M	0.15 M	2.6:1	7.5 M urea	15–20	Tikhonov et al. (2001)
3 h	RTP	8.2	0.10 M	0.01 M	10:1	7 M urea	50	Cowley and Mackin (1997)
4 h	25 °C	9.5	0.2 M	0.02 M	10:1	8 M urea	10–15	Kim et al. (2015)
4 h	25 °C	11	0.2 M	0.02 M	10:1	8 M urea	10–15	Min et al. (2011)
6 h	NA	8.9	NA	NA	2:1	8 M urea	3	Castellanos-Serra et al. (1996)
6 h	37 °C	NA	0.8 M	0.3 M	2.6:1	8 M urea	2	Nilsson et al. (1996)
12 h	4 °C	9.5	0.2 M	0.02 M	10:1	8 M urea	10–15	Min et al. (2011)
12 h	NA	9–11	3% w/w	1.5% w/w	4.9:1	6 M GdnHCl	NA	Petrides et al. (1995)
12 h (24 h for pretreated cells)	RTP	NA	0.4 M	— ^b	—	8 M urea and 6 M GdnHCl	10	Redwan et al. (2007)
24–48 h	RTP	9.0	1.25 g/g of sample	0.55 g/g of sample	5.5:1	8 M urea	NA	Astolfi et al. (2004)

NA information not available, RTP room temperature

^aPotassium tetrathionate was used

^b0.4 mM cysteine, 1 mM copper sulfate pentahydrate, and 5 mM nickel (II) chloride hydrate were used

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.

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	[71]	[72]	[19]	[73]

Insulin type	Structure	Action	Host system	Manufacturer	Brands
Human insulin	Identical to native human insulin	Fast/short/intermediate/long-acting depending on formulation	<i>E. coli</i>	Berlin-Chemie	Berlinsulin
				Bioton	Gensulin
				Eli Lilly & Co	Huminsulin, Humulin
				Landsteiner Scientific	Bonglixan
				Sanofi	Insulin Human Winthrop, Insuman
				SciGen Ltd	Scilin
				Tonghua Dongbao	Gansulin
			<i>H. polymorpha</i>	Wockhardt	Wosulin
			<i>P. pastoris</i>	Biocon	Insugen
			<i>S. cerevisiae</i>	Novo Nordisk	Actraphane, Actrapid, Insulatard, Mixtard, Monotard, Novolin, Protaphane, Ultratard, Velosulin
Insulin lispro	Engineered: inversion of native B28-B29 proline-lysine sequence	Inhalable; Ultra rapid-acting	<i>E. coli</i>	MannKind	Afrezza
		Fast-acting	<i>E. coli</i>	Eli Lilly & Co	Humalog, Liprolog
		Short-acting	<i>E. coli</i>	Sanofi	Admelog
				Gan & Lee	Prandilin
Insulin glargine	Engineered: A 21 asparagine replaced by glycine and B chain elongated by two arginines	Long-acting	<i>E. coli</i>	ACI Limited	Clarine
				Eli Lilly & Co	Abasaglar, Basaglar
				Gan & Lee	Basalin
				Getz Pharma	Basagine
				Incepta Pharmaceuticals	Vibrenta
				Merck	Lusduna Nexvue
				Sanofi	Lantus, Optisulin, Toujeo
				Wockhardt	Glaritus
				<i>P. pastoris</i>	Biocon
Insulin aspart	Engineered: B28 proline replaced by aspartic acid	Fast-acting	<i>S. cerevisiae</i>	Novo Nordisk	NovoRapid, Novolog, Fiasp
Insulin glulisine	Engineered: B3 asparagine is replaced by a lysine and B29 lysine is replaced by glutamic acid	Fast-acting	<i>E. coli</i>	Sanofi	Apidra
Insulin detemir	Engineered: devoid of B30 threonine and a C14 fatty acid is covalently attached to B29 lysine	Long-acting	<i>S. cerevisiae</i>	Novo Nordisk	Levemir
Insulin degludec	Engineered: devoid of B30 threonine and hexadecanedioic acid via gamma-L-glutamyl spacer is conjugated to B29 lysine	Ultra-long acting	<i>S. cerevisiae</i>	Novo Nordisk	Tresiba