



*Inżynieria Białek*

# Inżynieria białek

1

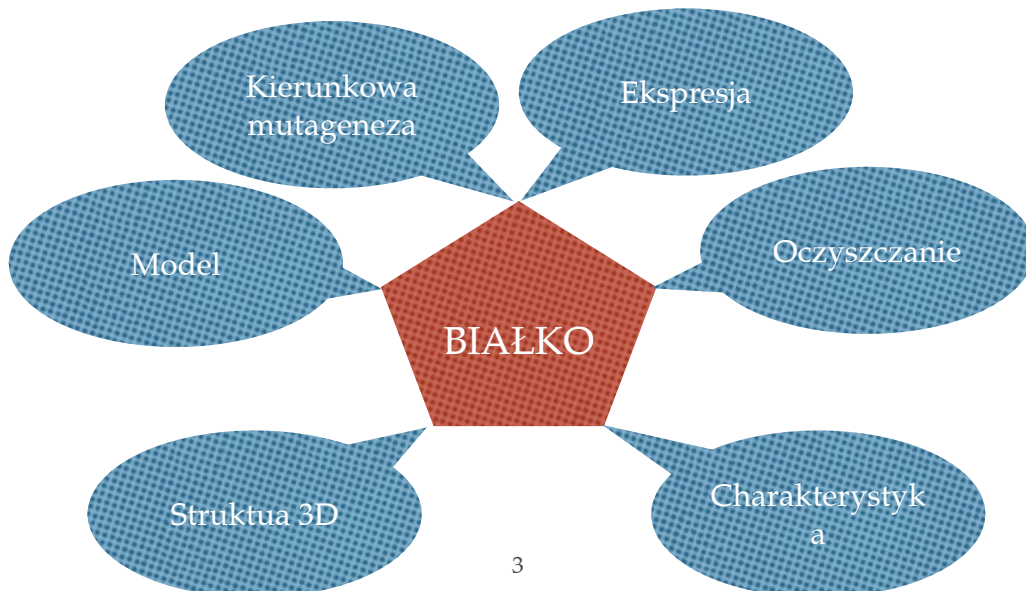
# Inżynieria

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

2

# Podjęcie klasyczne...

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



# Podjęcie współczesne...

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

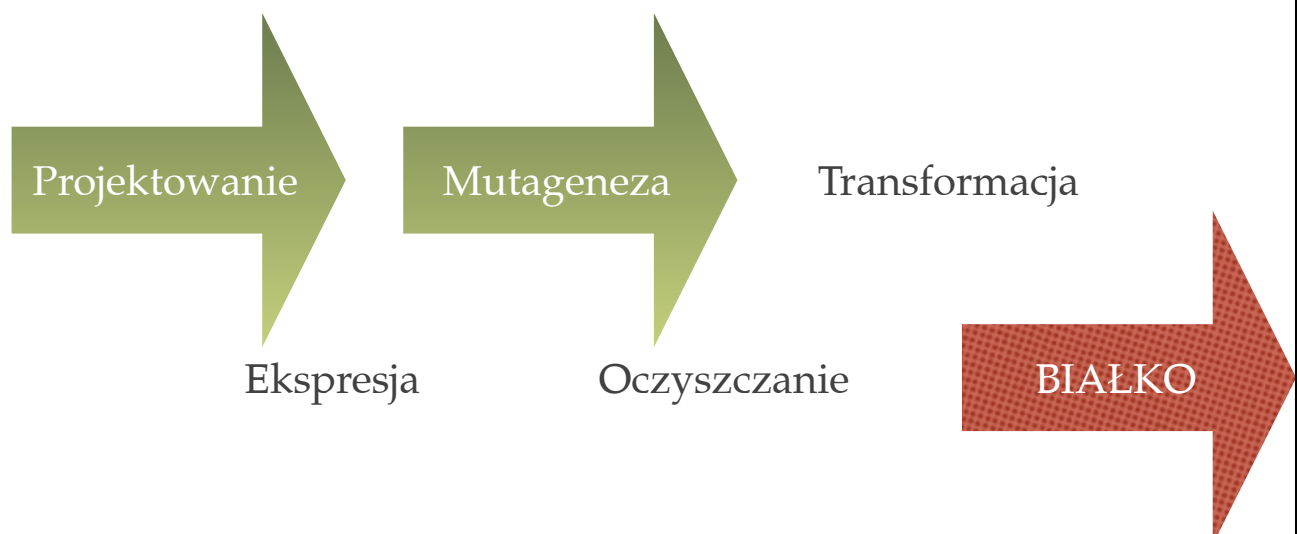


# Możliwości...

- pozwala na zmiany i optymalizację kluczowych właściwości białek:
  - stabilności
  - selektywności
  - powinowactwa
  - aktywności
  - odporności na degradację proteolityczną
  - rozpuszczalność
  - poziom „ekspresji”
- dzięki metodom inżynierii można wyizolować pojedyncze funkcjonalne domeny (najmniejsze aktywne fragmenty) z
  - 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

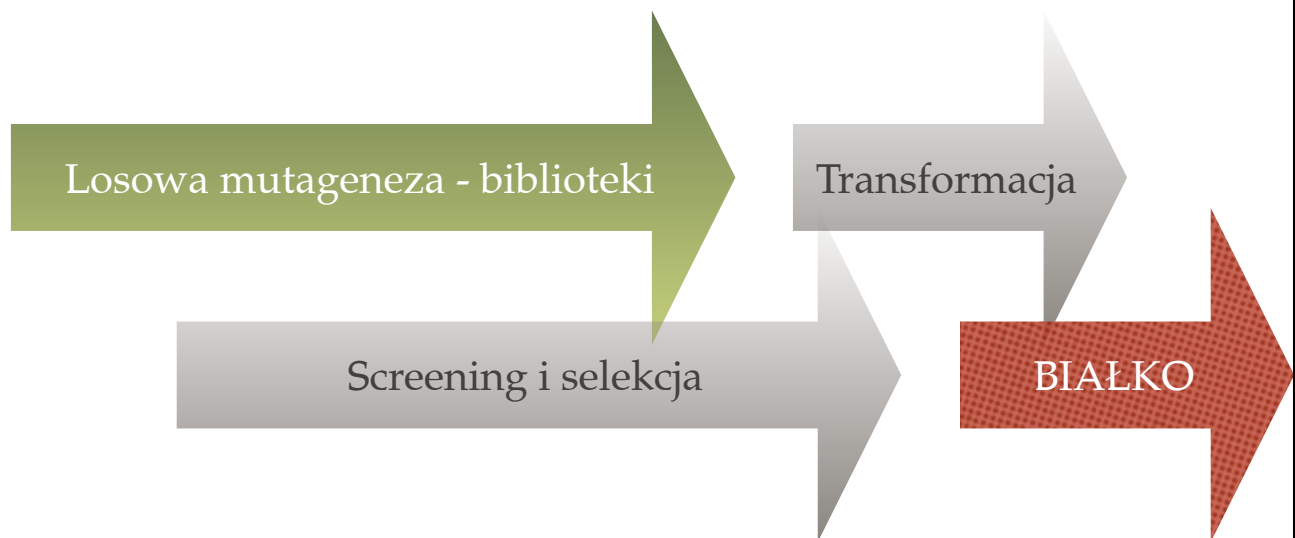
5

# Ulepszony enzym...



6

# Ulepszony enzym...



7

## Poprawianie stabilności

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

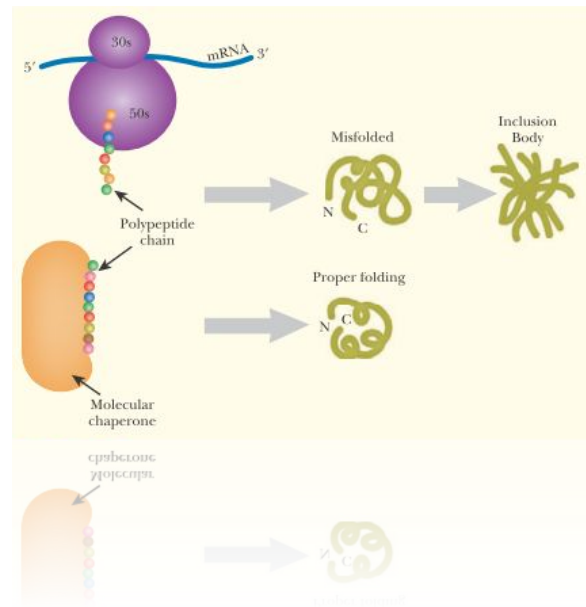
**Table 10.2** N-Terminal Rule for Protein Stability

N-Terminal Residue	Approximate Half-Life (Minutes)
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	120
Ile, Glu, Tyr	30
Gln, Pro	10
Leu, Phe, Asp, Lys, Arg	2-3
Met, Gly, Ala, Ser, Thr, Val	5-3
Gln, Pro	10

8

# Poprawianie stabilności

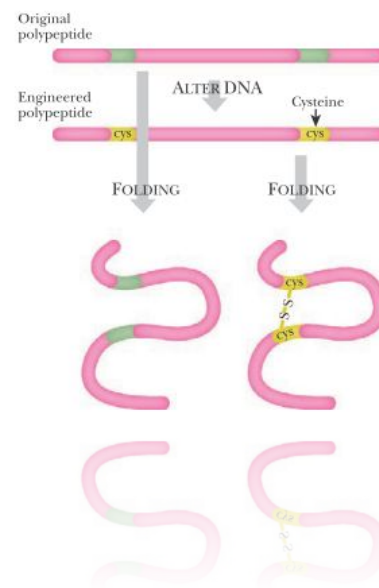
- pojawianie się ciałek inkluzyjnych oznacza najczęściej, że produkowane białko jest słabo rozpuszczalne lub produkowane zbyt szybko
- w takiej sytuacji najlepiej wprowadzić do systemu dodatkowe czaperony, które zapewnią prawidłowe fałdowanie



9

# Poprawianie stabilności

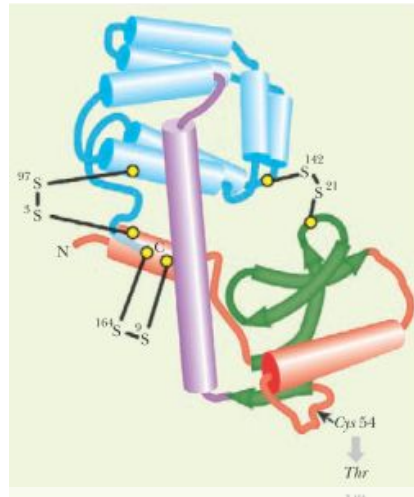
- mostki dwusiarczkowe nie tylko determinują strukturę trójwymiarową białka, zapewniają także jego stabilność i podnoszą odporność na utlenianie (co w warunkach przemysłowych czyli pozakomórkowych jest bardzo istotne) – wprowadzenie dodatkowych mostków podnosi stabilność białka
- wprowadza się dodatkowe 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



10

# 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

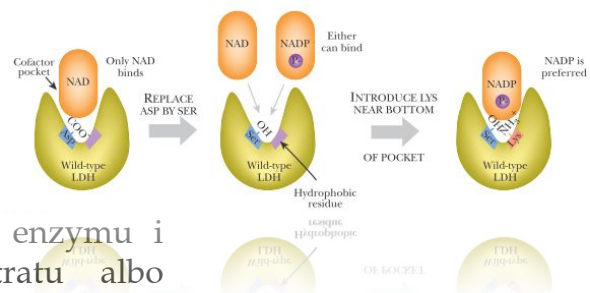


**Table 11.2** Disulfide Stabilization of T4 Lysozyme

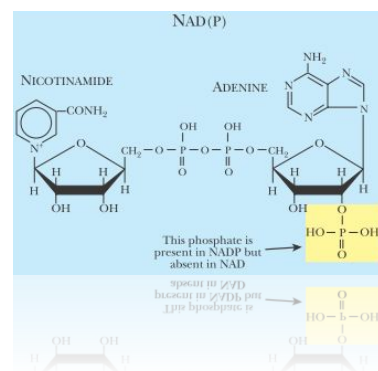
Protein	Disulfide Bonds Present			Stability as T <sub>m</sub>	Activity (%)
	3-97	9-164	21-142		
Original	-	-	-	41.9	100
1	+	-	-	46.7	96
2	-	+	-	48.3	106
3	-	-	+	52.9	0
4	+	+	-	57.6	95
5	-	+	+	58.9	0
6	+	+	+	65.5	0

11

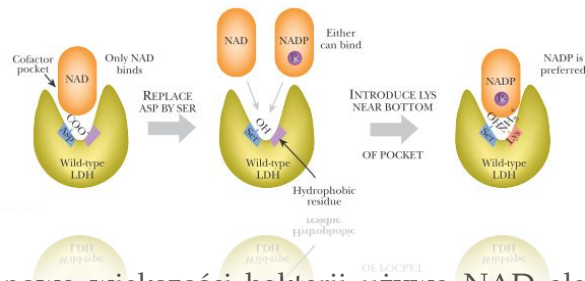
# Miejsce aktywne



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



# Miejsce aktywne

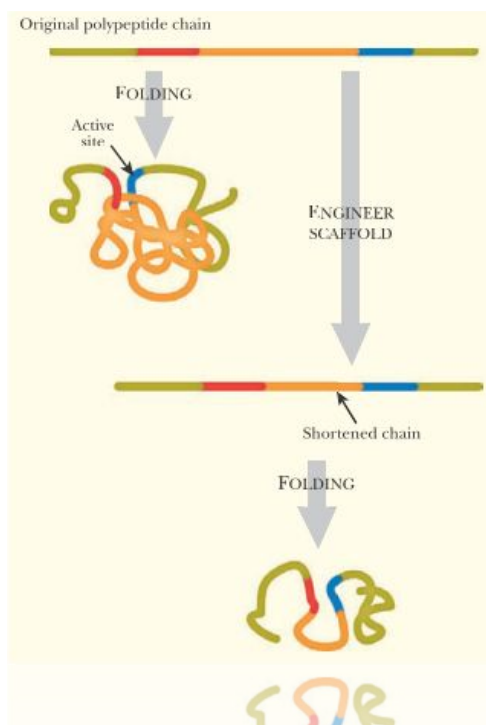


- dehydrogenaza mleczanowa większości bakterii używa NAD ale nie NADP, w reakcji przekształcania pirogronianu w mleczan
- w miejscu wiązania kofaktora znajduje się ujemnie naładowany asparaginian (co wyklucza wiązanie NADP) – jeżeli zamieni się go na obojętny (np Ser) enzym będzie mógł związać oba kofaktory.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

13

# Zmiana architektury

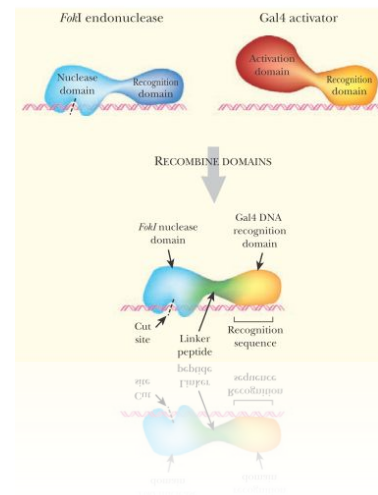
- w enzymach miejsce aktywne buduje stosunkowo niewiele AA
- pozostałe stanowią trójwymiarowe rusztowanie odpowiedzialne za to, żeby odpowiednie reszty znalazły się w odpowiednim miejscu w przestrzeni
- bardzo często takie rusztowanie jest znacznie większe niż trzeba – np.  $\beta$  galaktozydaza z *E.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



14

# Rekombinacja domen

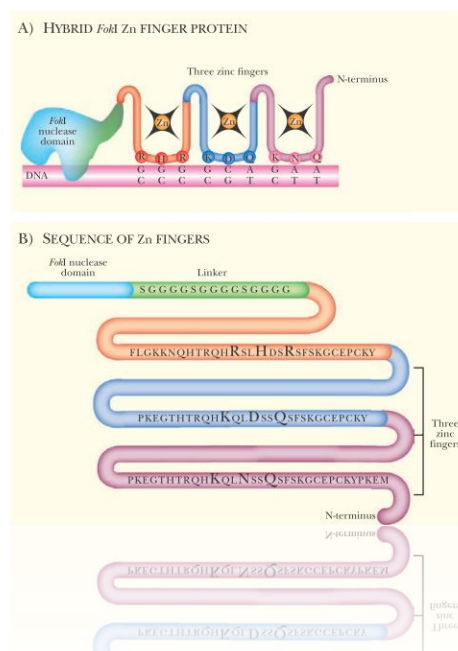
- łączą się domeny funkcjonalne z różnych białek
- enzymy restrykcyjne - połączenie domeny tnącej Fok I z inną sekwencyjnie specyficzną domeną wiążącą DNA. Fok I jest enzymem restrykcyjnym II typu z domenami N końcową (rozpoznawanie sekwencji DNA) i C końcową (cięcie DNA). Sama domena endonukleazowa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



15

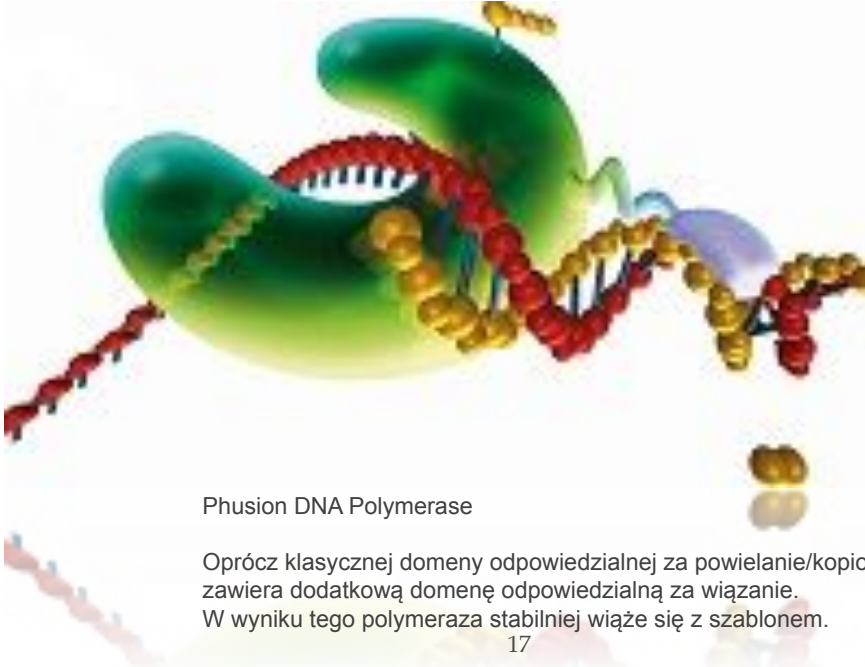
# Rekombinacja domen

- 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

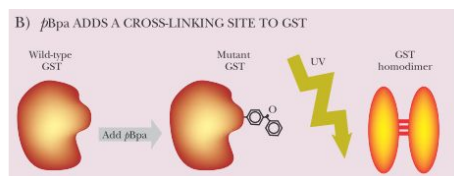


16

# Rekombinacja domen

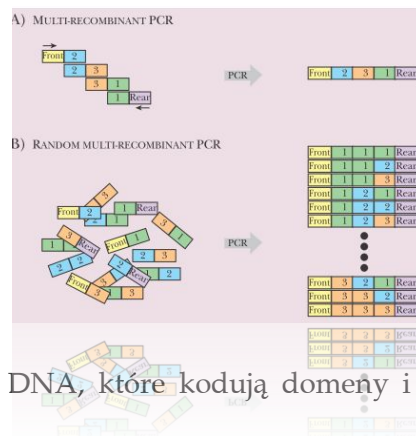


# Modyfikacja AA



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

# Biblioteki



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

19

# Systemy ekspresji

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

20

# Charakterystyka organizmów wykorzystywanych do produkcji białek rekombinowanych

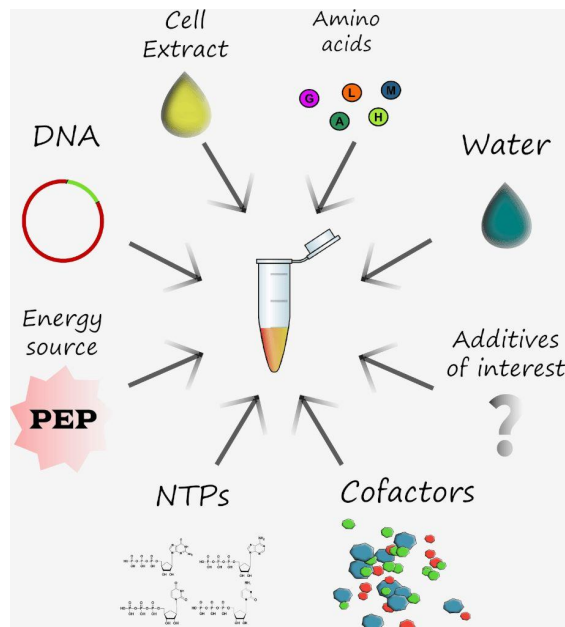
Characteristics	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
<b>Growth speed</b>	Fast ( $T_d \sim 20-30$ min)	Fast ( $T_d \sim 90$ min)	Slow ( $T_d \sim 24-30$ h)	Slow ( $T_d \sim 24-30$ h)
<b>Growth medium</b>	Simple Cheap	Simple Cheap	Complex Expensive	Complex Expensive
<b>Expression level</b>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

Characteristics of commonly used host organisms for protein production.

# Systemy ekspresji



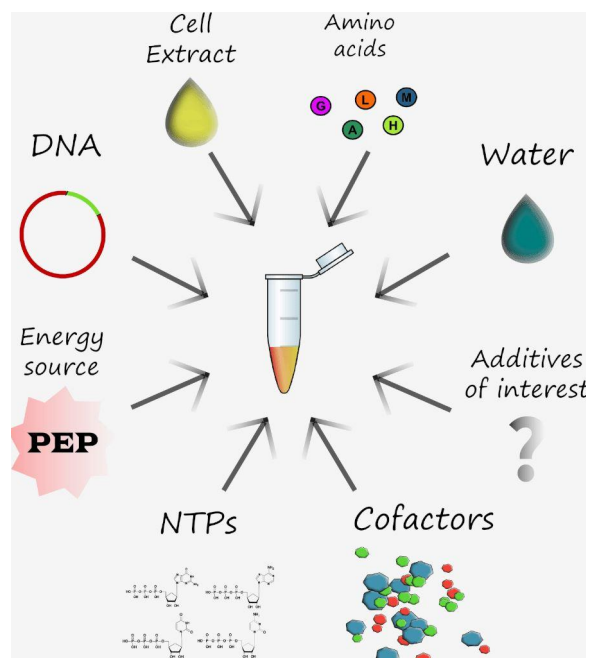
# Pozakomórkowe systemy ekspresji białek



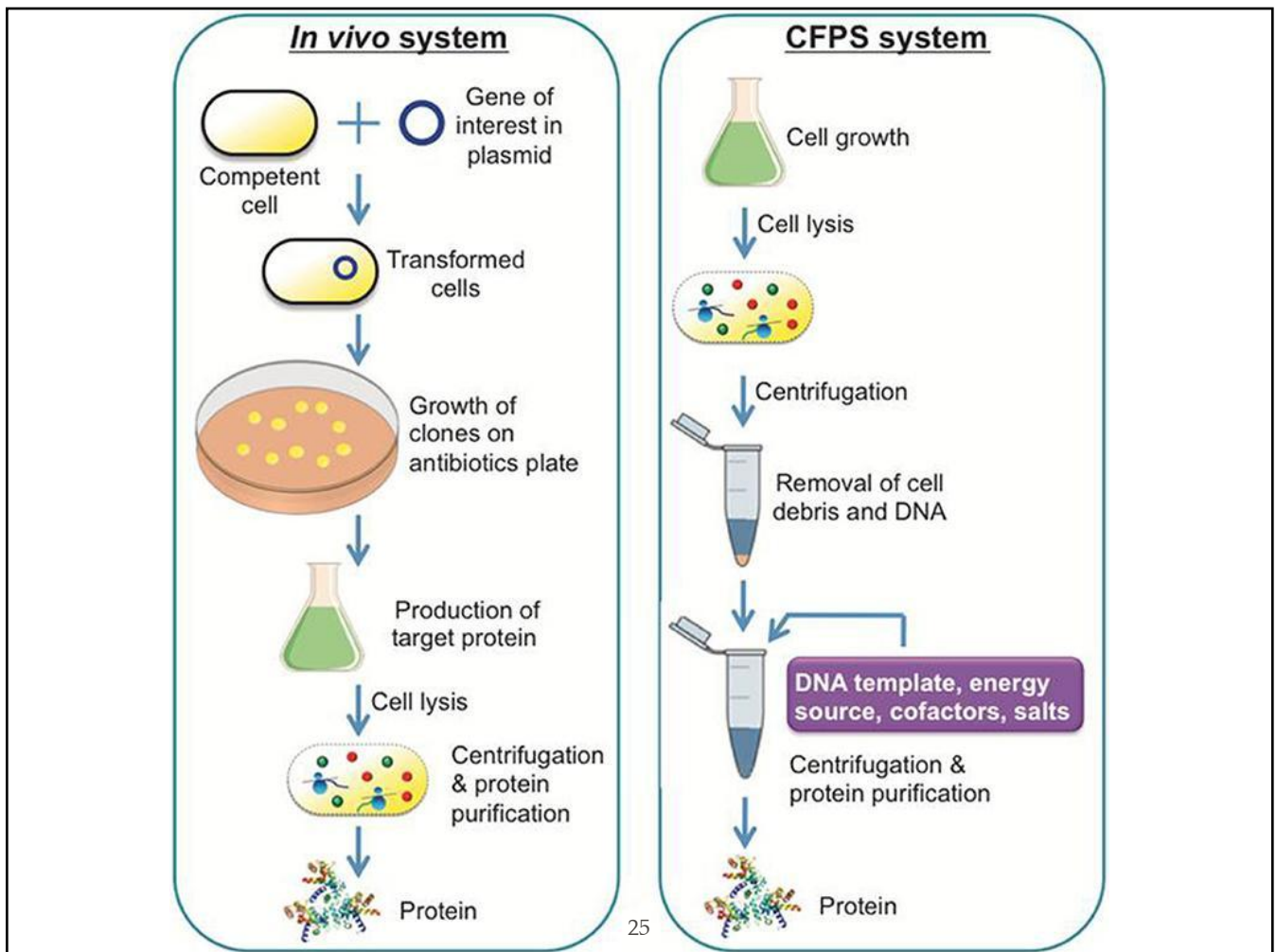
23

## CFPS

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



24



# 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

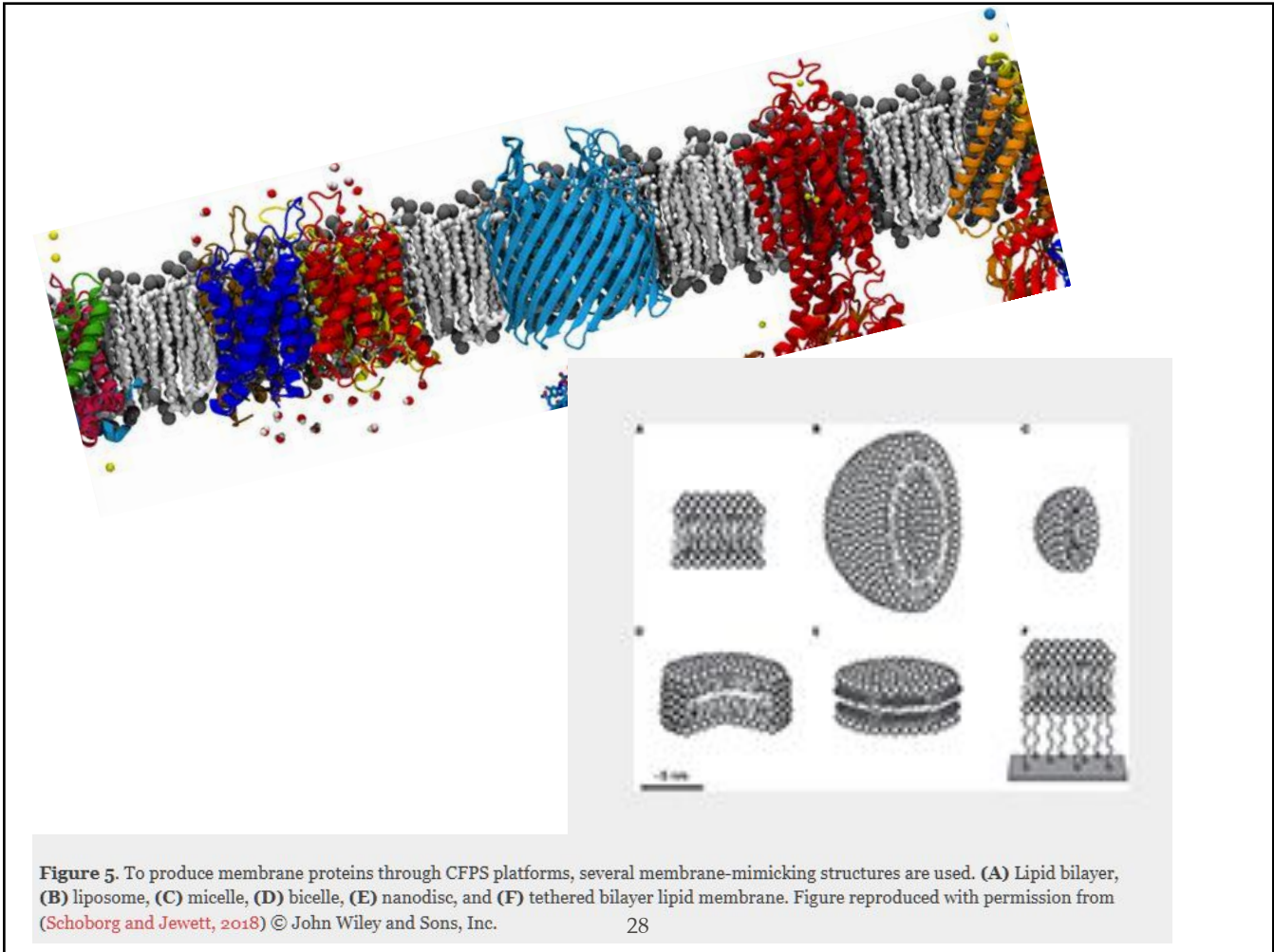
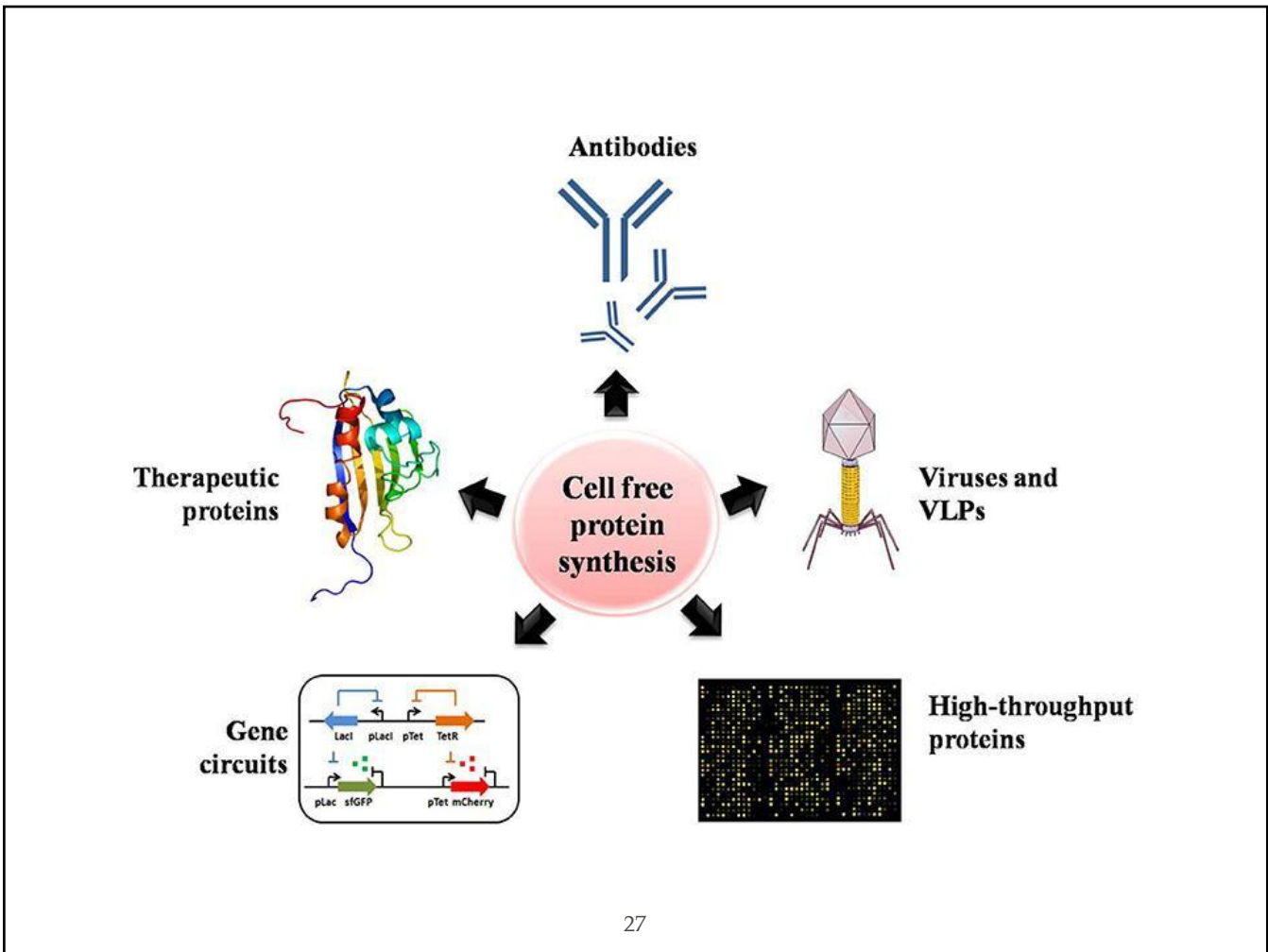
- Structural RNA analysis such as characterization of regulatory elements for translation (e.g., UTRs, Capping, IRES)
- RNA virus characterization

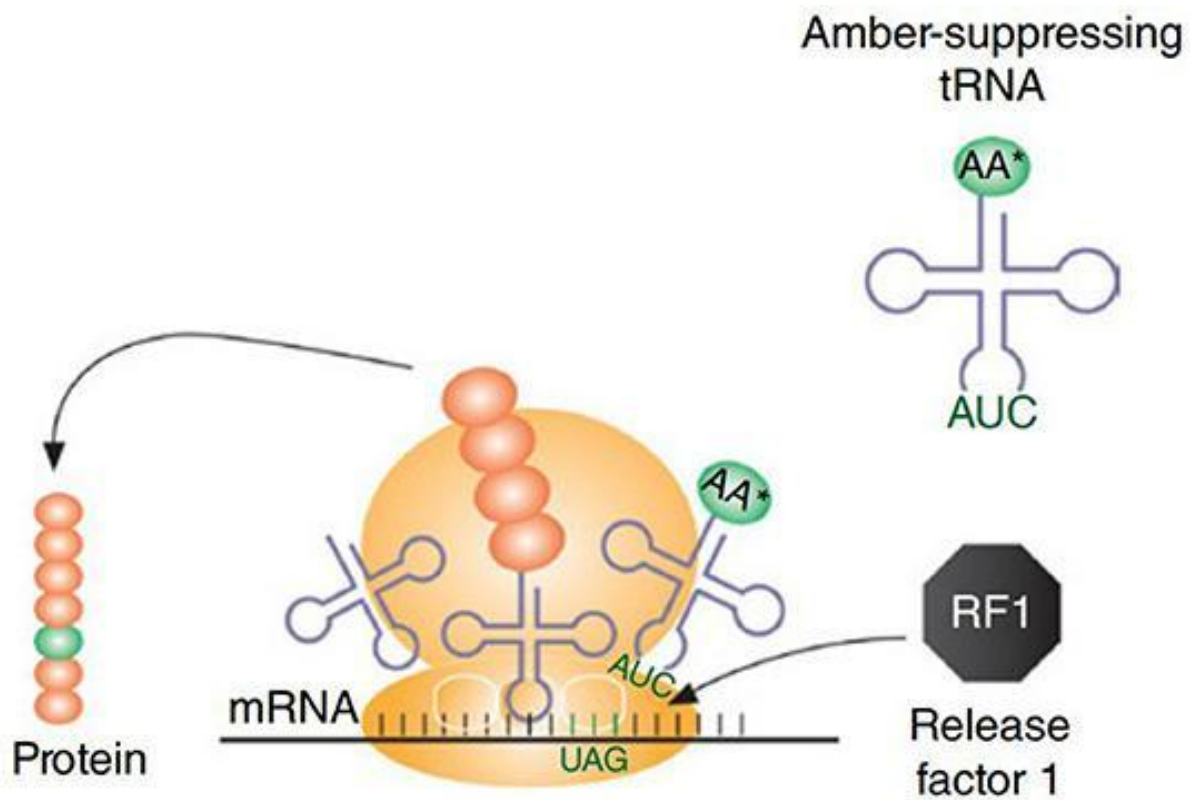
#### Screenings

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

#### Protein Labeling

- Open systems allow the incorporation of labeled amino acids

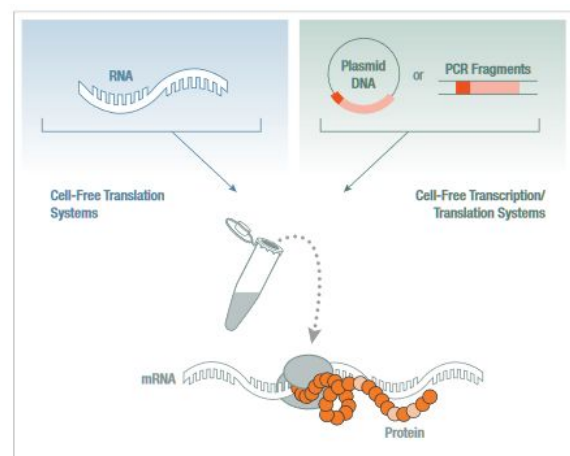




29

## Komponenty sytemu

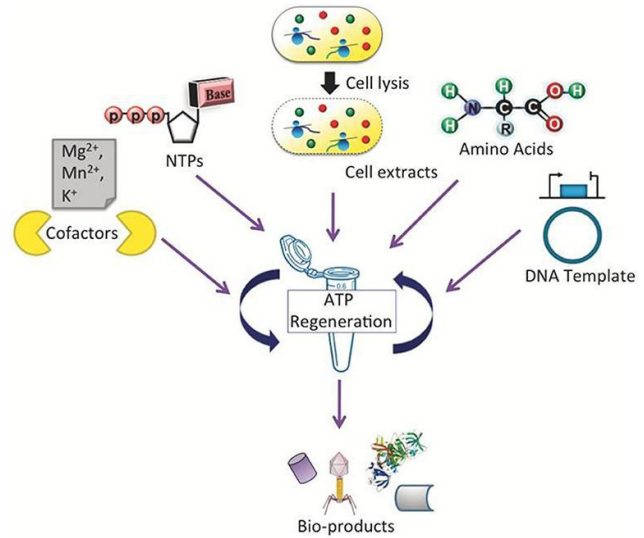
- Niezbędne elementy:
  - Rybosomy
  - tRNA
  - Aminoacylo-tRNA syntetazy
  - Czynniki inicjacji, elongacji, terminacji
- Aminokwasy
- Źródła energii (ATP, GTP)
- Systemy regeneracji energii
- Sole i inne składniki, np. bufory



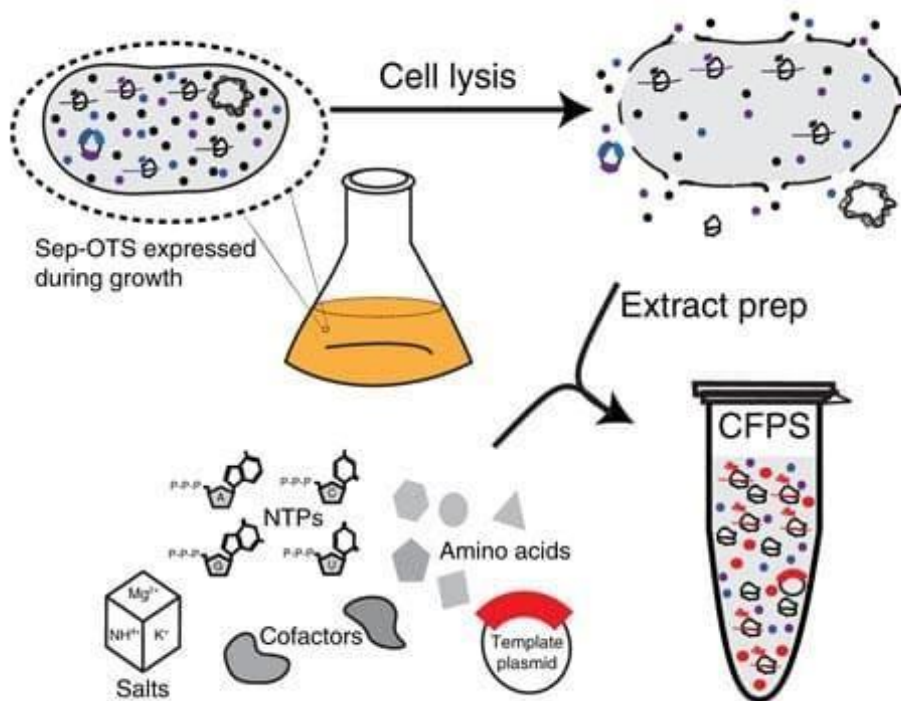
30

# Pochodzenie komponentów

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



31



32









33


# INSULINA LEK CORAZ BARDZIEJ DOSKONAŁY

Insulina **≠** Insulina  
dziś 100 lat temu

## POCZĄTKI LECZENIA INSULINĄ:

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

34



POLSKIE  
STOWARZYSZENIE  
DIABETYKÓW



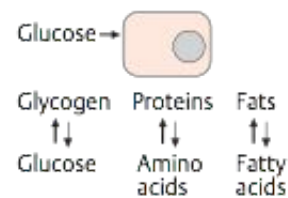
*IB w praktyce*

# Insulina

35

# Cukrzyca

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



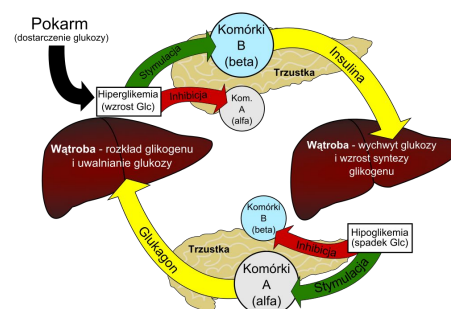
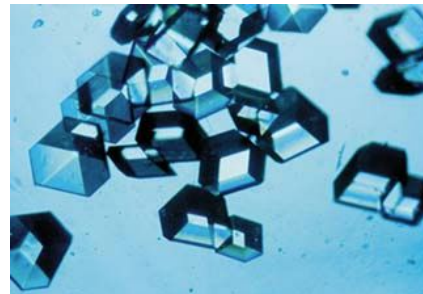
Glucose uptake by cells ↑  
Blood glucose ↓

Storage compounds:  
formation ↑  
degradation ↓

36

# Insulina

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



37

# Terapia insulinowa

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

38

# Produkcja

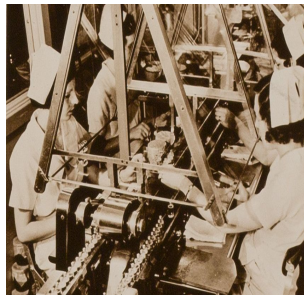
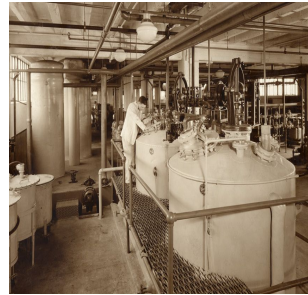
- 1922 odkrycie
- 1923 Eli Lilly, USA wprowadza pierwszą insulinę do obrotu
- 1923 Nordisk Insulinlaboratorium, Dania rozpoczyna produkcję insuliny z trzustki wołowej
- Za datę rozpoczęcia produkcji w Polsce przyjęto rok 1924, gdy w Państwowym Zakładzie Higieny uzyskano pierwsze 315 000 jednostek insuliny. 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

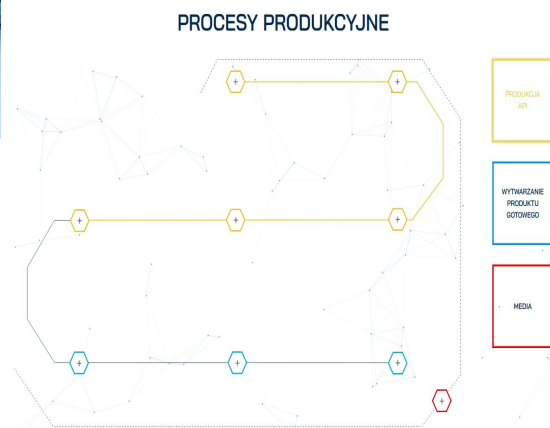


## Bioton

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

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

[Materiały prasowe]



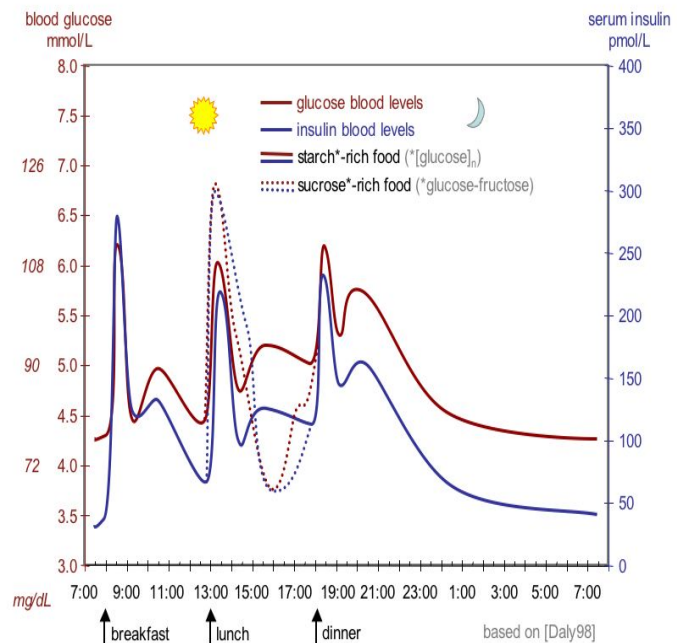
## Rodzaje insuliny

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

## Insulina rekombinowana

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

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

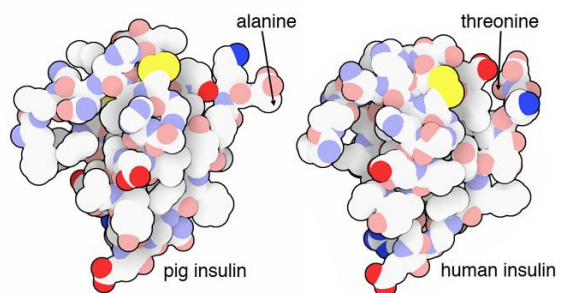


2023

49

# Historia insuliny farmaceutycznej

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



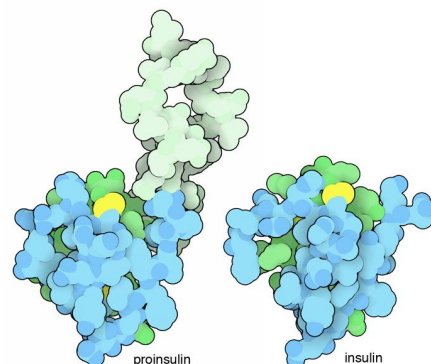
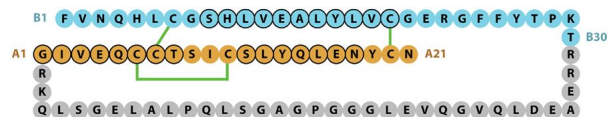
# Charakterystyka fizykochemiczna

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

51

# Struktura pierwszorzędowa

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



52

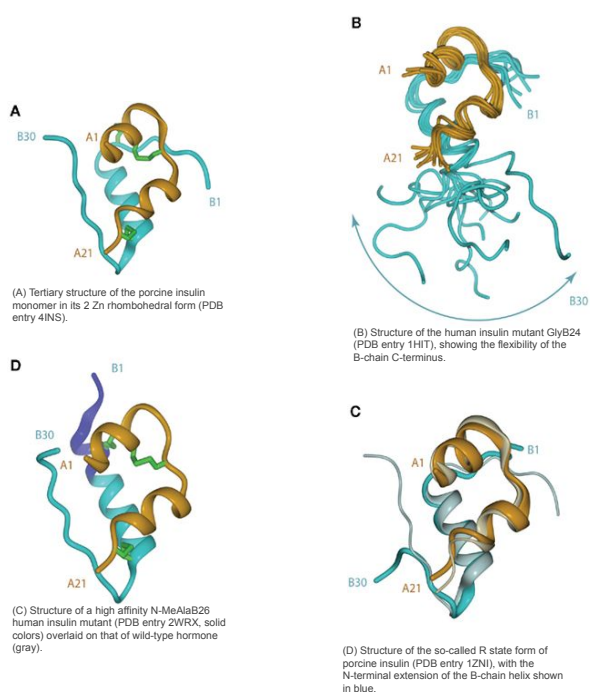
# Synteza

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

53

# Struktura

- 1969 Dorothy Hodgkin
  - *'The B-chain consists of an N-terminal segment (residues B1–B6), a type II  $\beta$ -turn (B7–B10) a central  $\alpha$ -helix (B9–B19), a type I  $\beta$ -turn (B20–B23), and a C-terminal  $\beta$ -strand (B24–B28), followed by residues B29 and B30, which are less well ordered (Figure 2A). The A-chain consists of an N-terminal  $\alpha$ -helix (A1–A8), a non-canonical turn (A9–A11), a second  $\alpha$ -helix (A12–A18), and a C-terminal segment (A19–A21).'*



54

# Inżynieria insuliny

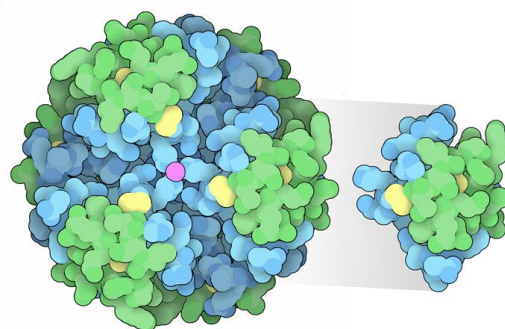
- Cele:

- źródło

- białko rekombinowane *vs.* naturalne

- czas działania

- uwalnianie produktu
- wydłużenie działania



PDB ID: 1TRZ

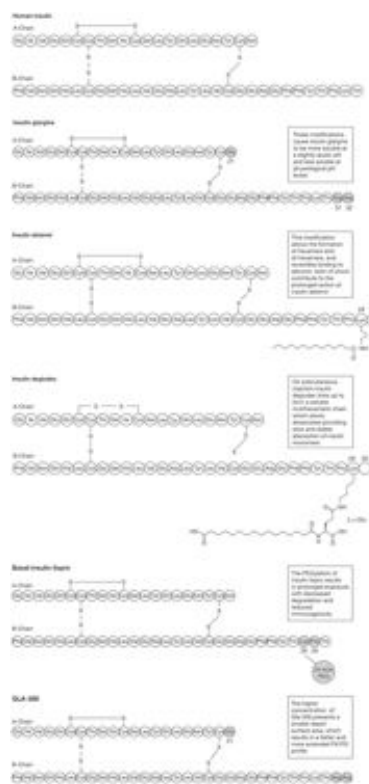
55

# Uwalnianie produktu

- fuzja z białkami zmniejszającymi rozpuszczalność (protamina)

- wprowadzenie mutacji:

- 2xArg, Asp-Gly
- Glargine (Lantus™)



56

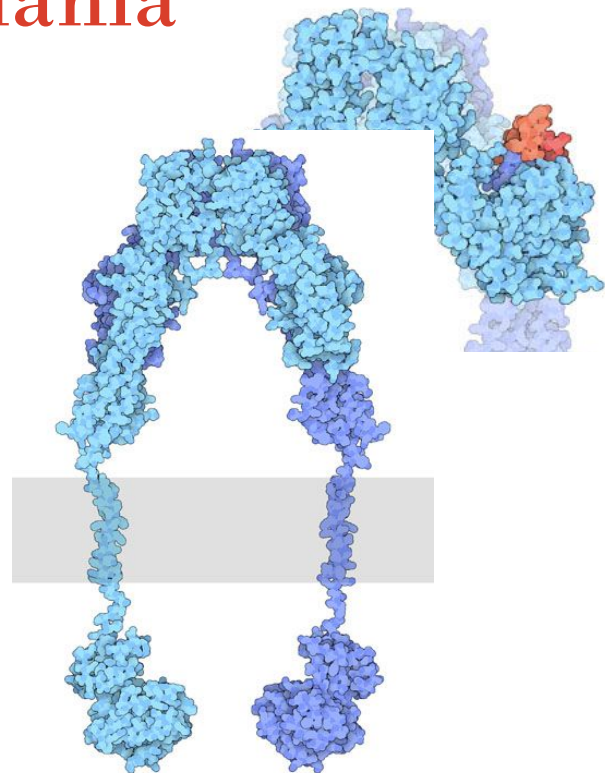
# Wydłużenie działania

- Insulin *vs.* glukagon

- spadek stężenia glukozy we krwi powoduje uwolnienie glukagonu z trzustki i stymulację wątroby do 'produkcji' glukozy
- wzrost stężenie glukozy we krwi powoduje uwolnienie przez trzustkę insuliny, która stymuluje wchłanianie glukozy przez komórki

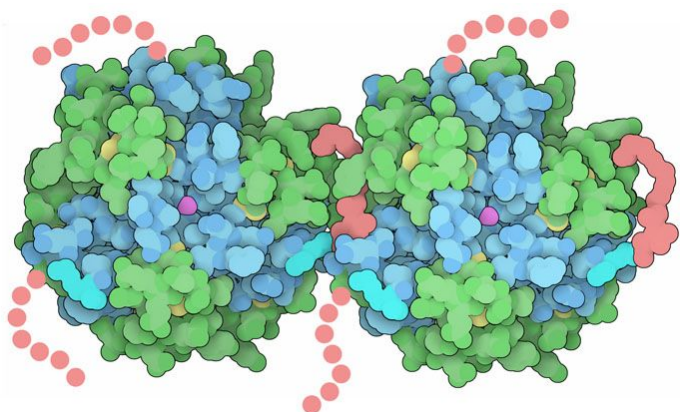
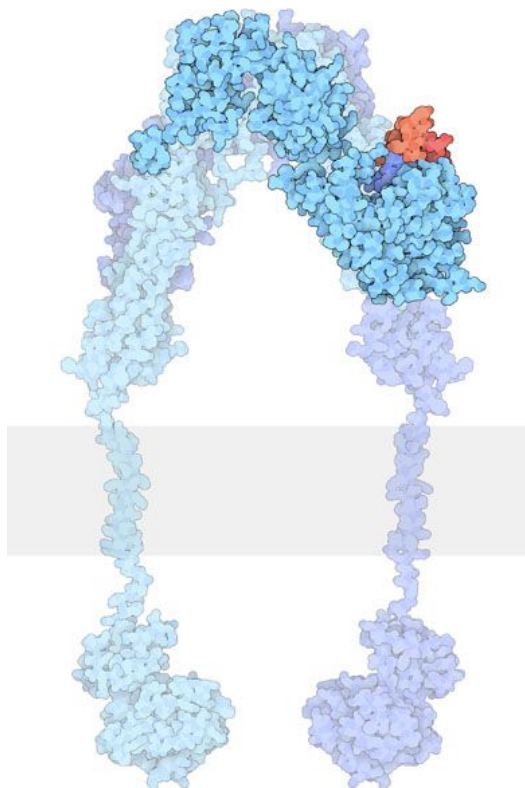
- Receptor

- dimer połączony w dwoma cząsteczkami kinaz



PDB ID:3LOH

57



58

# 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]

- Front. Endocrinol., 22 November 2011  
DOI:10.3389/fendo.2011.00076
- Diabetes/Metabolism Research and Reviews  
DOI: 10.1002/dmrr.2763
- Molecule of the month  
DOI:10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2016\_2  
DOI:10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2015\_2

*IB w praktyce*

# Katalizatory enzymatyczne

63

## Kataliza przemysłowa

### • Rodzaje katalizy:

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



64

# Katalizator

- Wsparcie:
  - umiejscowienie miejsc aktywnych na nośniku pozwalającym zmaksymalizować jego powierzchnię aktywną
- Odporność:
  - minimalizacją wpływu substancji deaktywujących katalizator / inhibitorów
- Regeneracja:
  - odnowa katalizatora pomiędzy cyklami produkcyjnymi

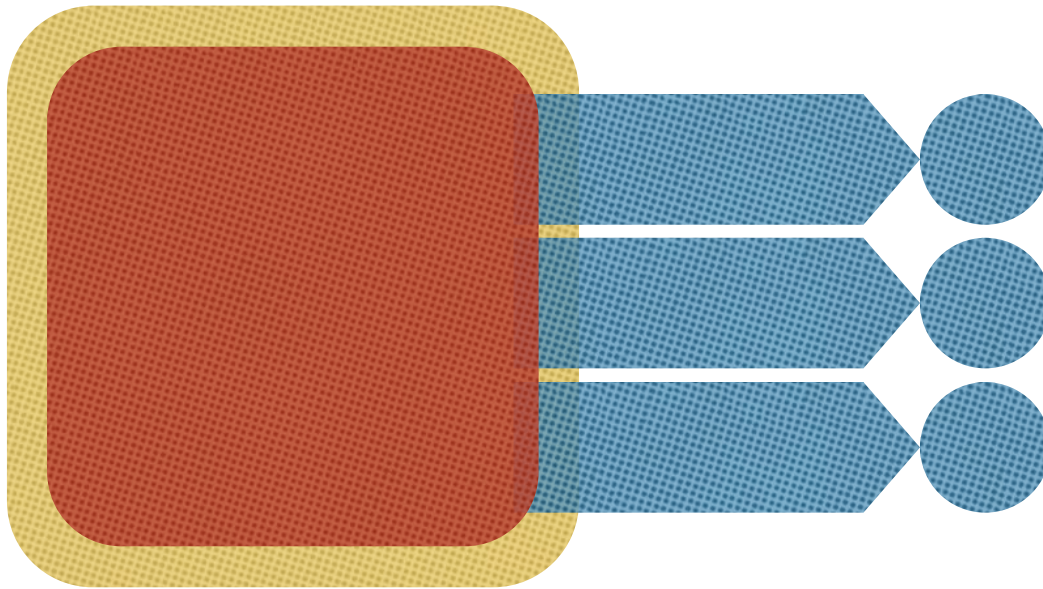
65

# Katalizator enzymatyczny

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

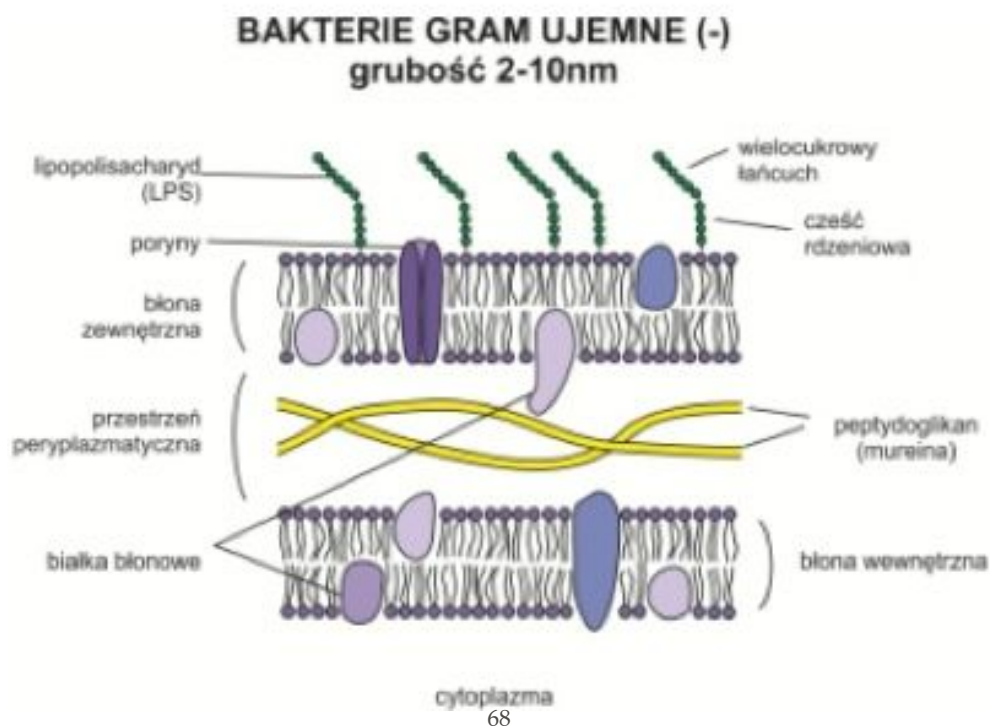
66

# Katalizator enzymatyczny



67

# Sekrecja u bakterii gram-ujemnych

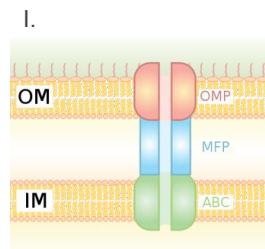


68

# Typy sekrecji

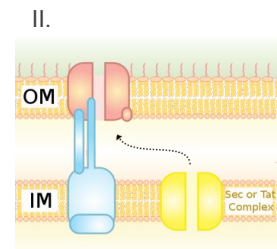
## • Typ I

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



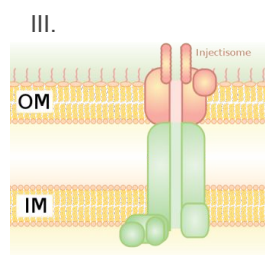
## • Typ II

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



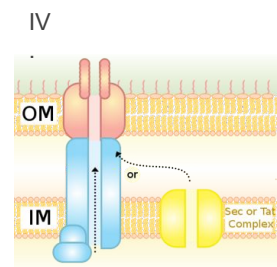
## • Typ III

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



## • Typ IV

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

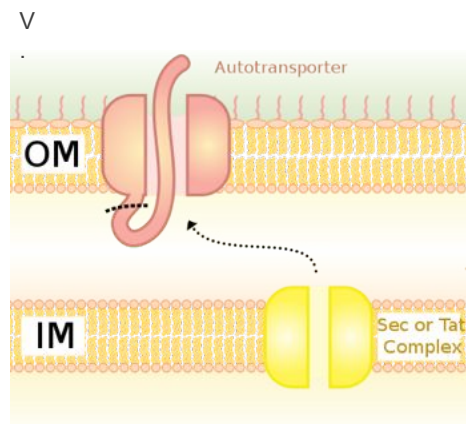


69

# Typ V - autotransportery

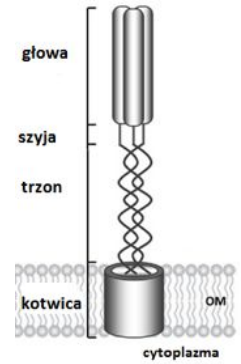
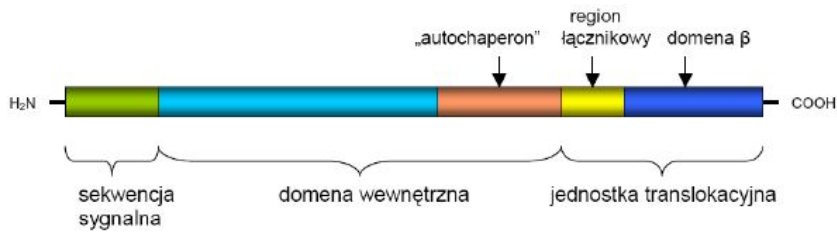
## • Typ V

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

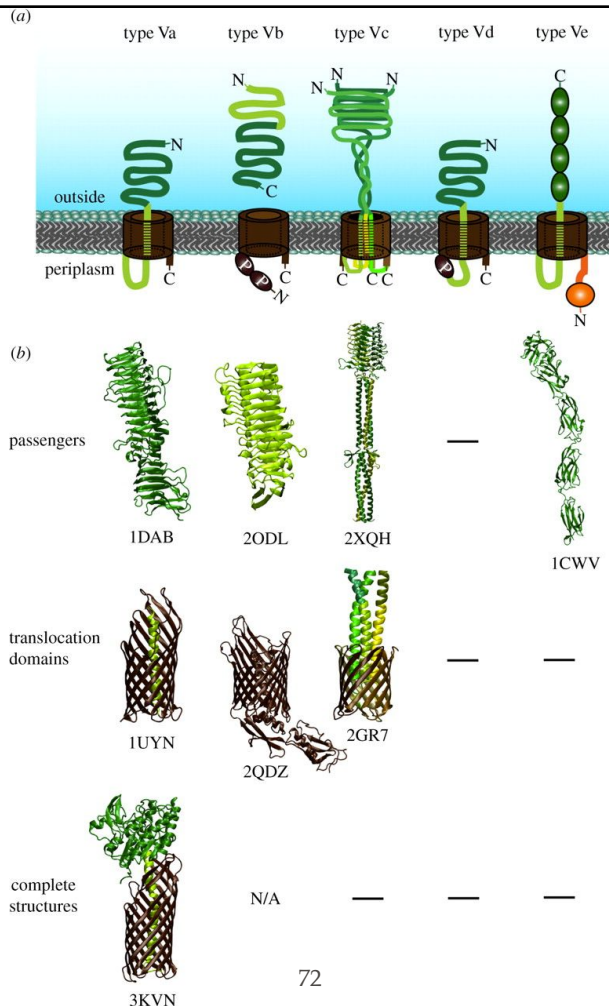


70

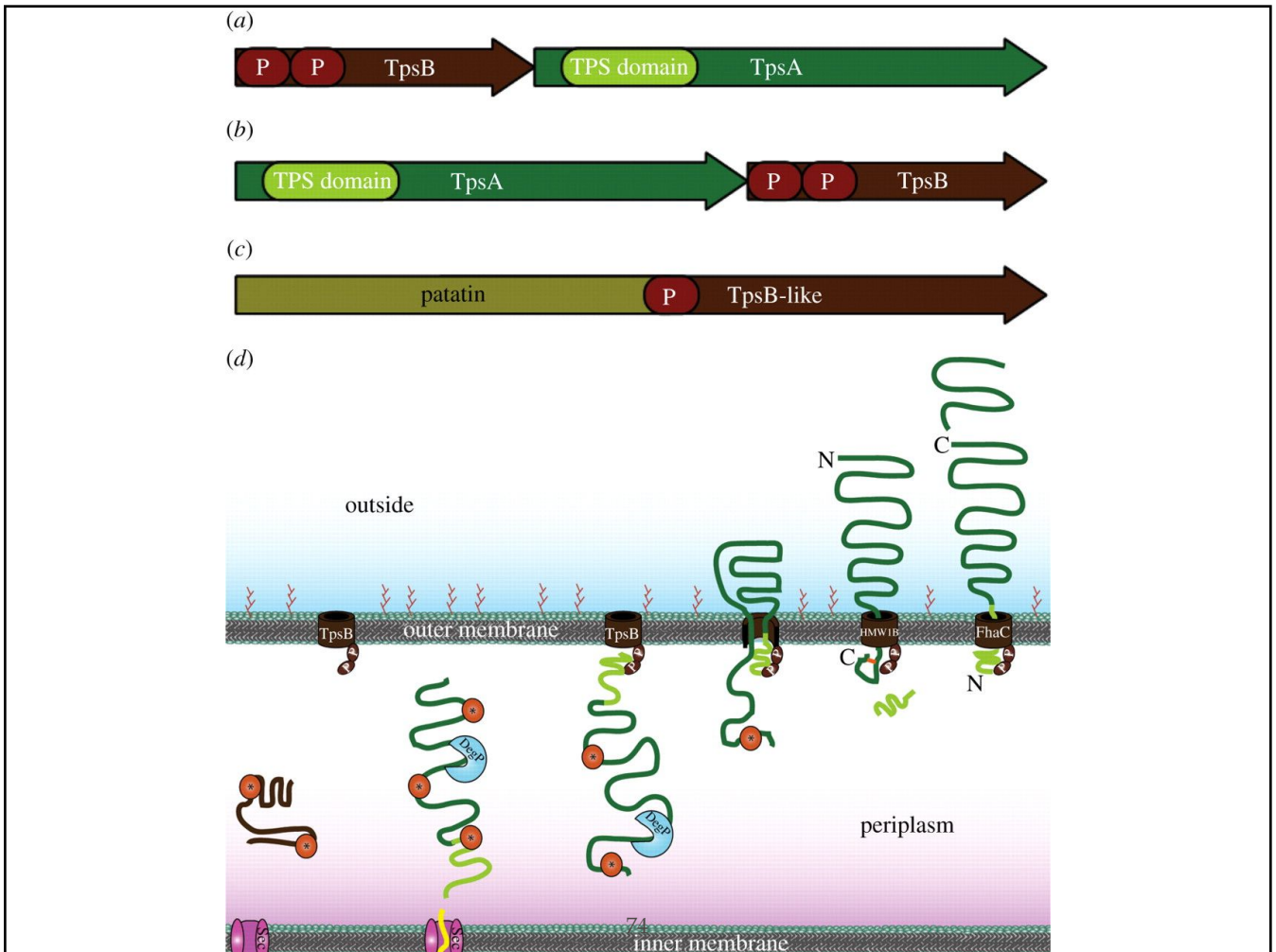
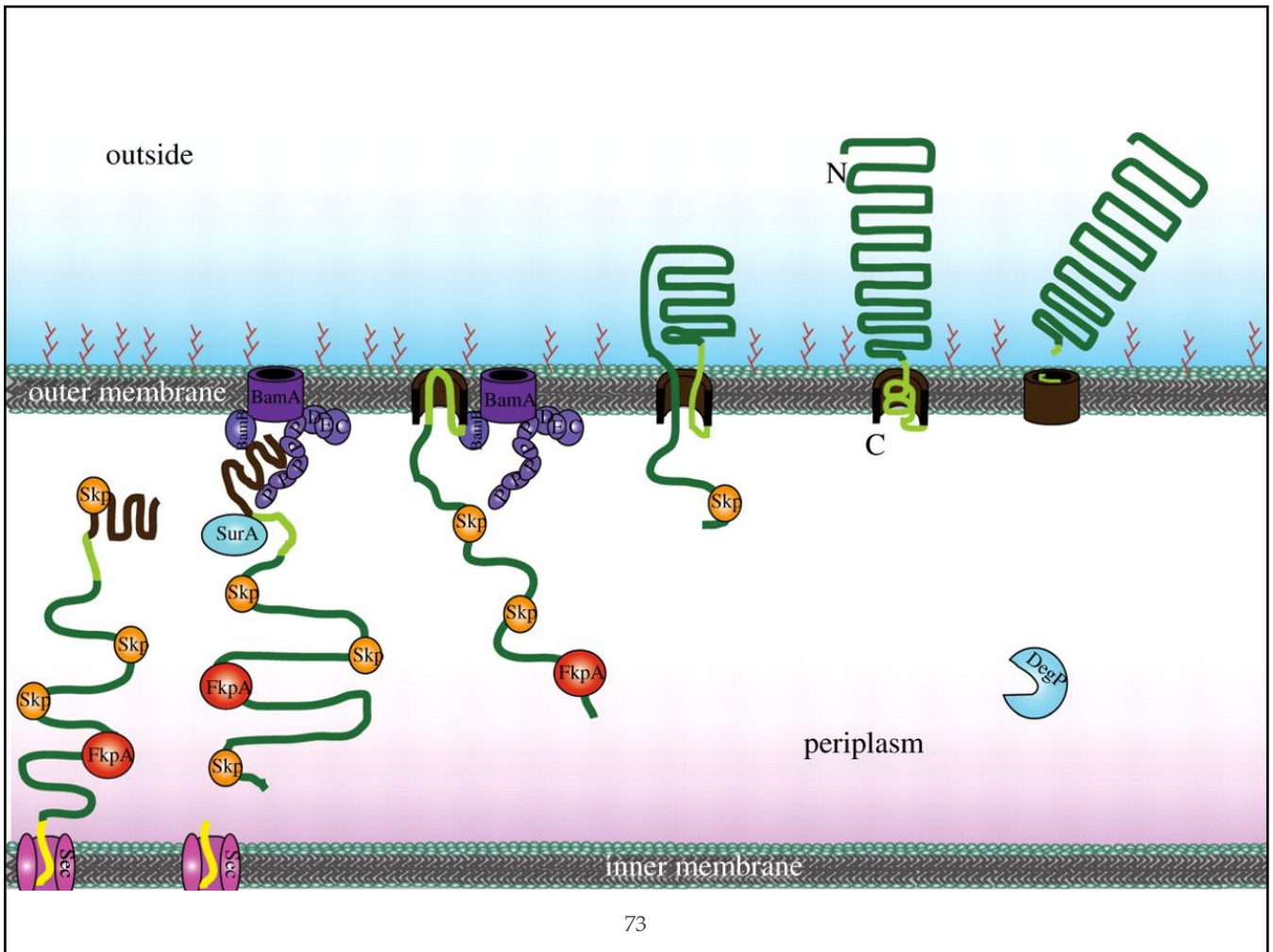
# Typ V - autotransportery

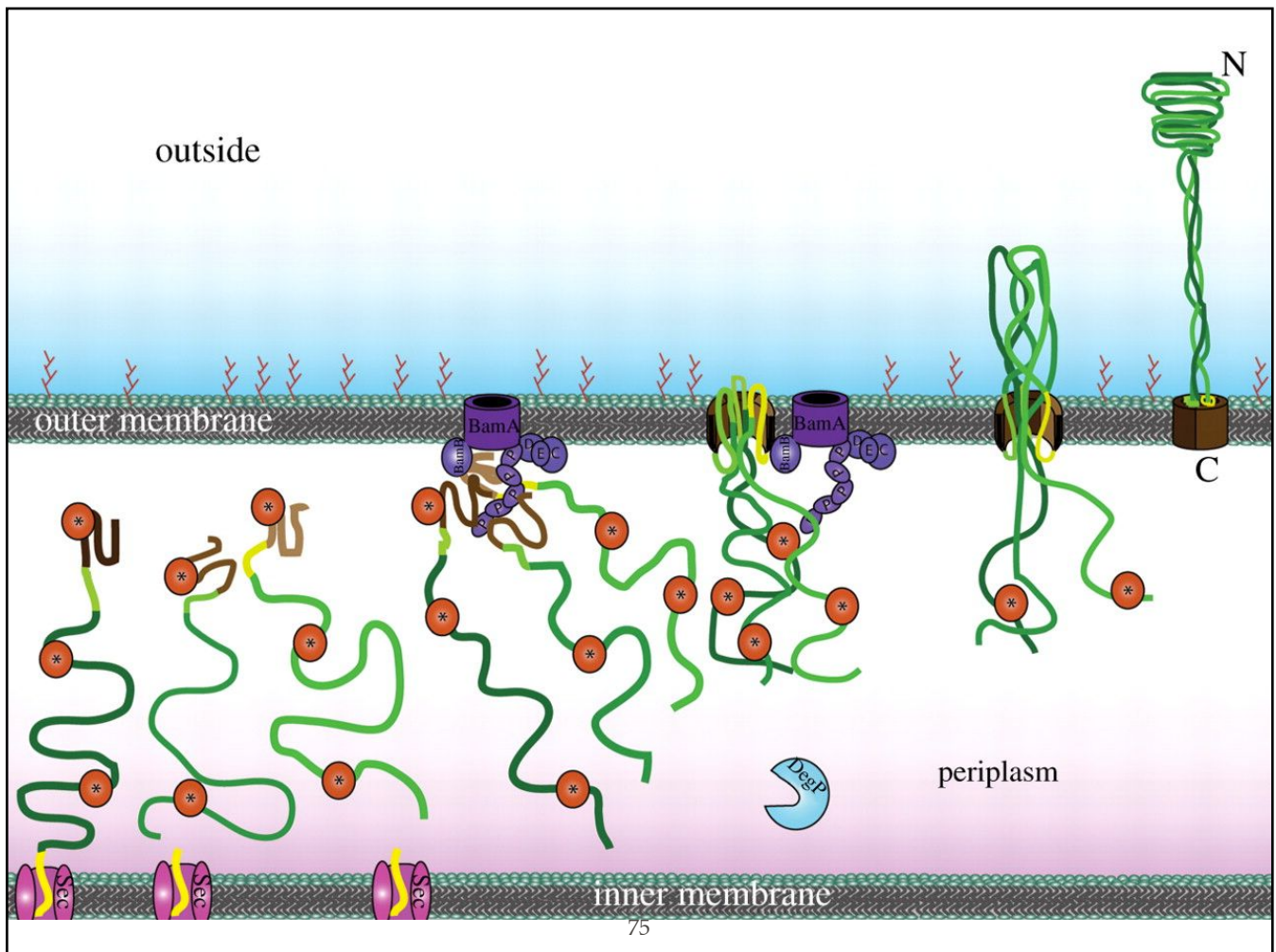


71



72



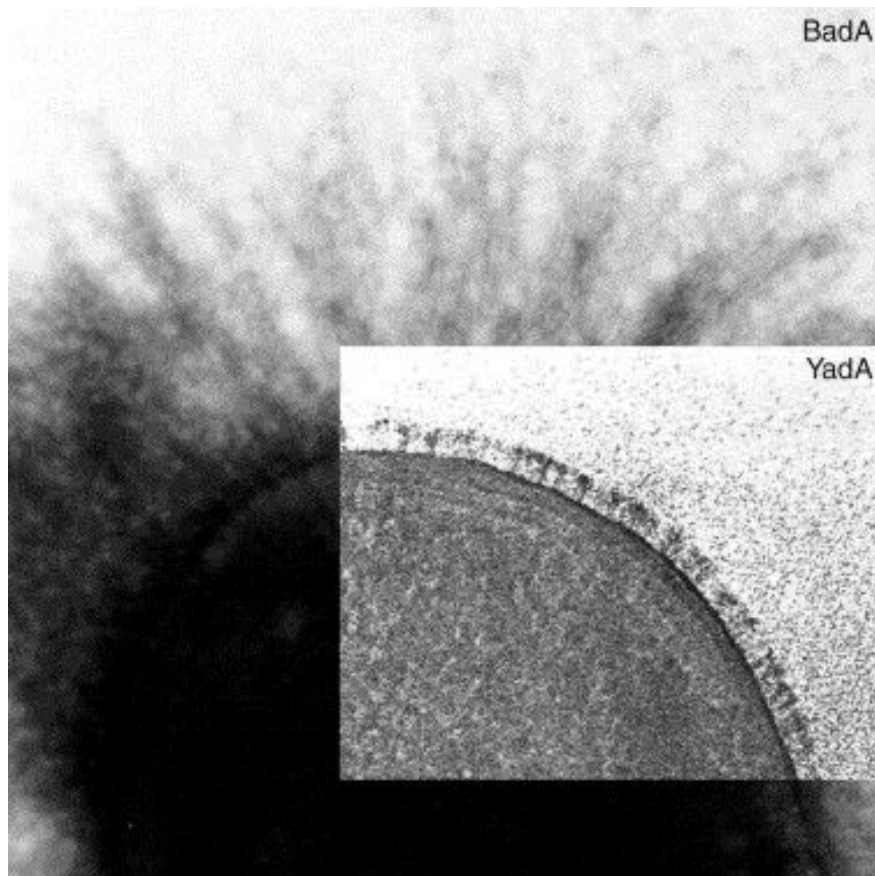


## YadA prototypowy TAA (Trimeric Autotransporter Adhesin)

### • Pochodzenie:

- bakterie z rodzaju *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*).
- Czarna śmiera – 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 śmieri wybuchła w Azji Środkowej, być może Chinach, skąd przez jedwabny szlak w 1346 dostała się na Krym, skąd prawdopodobnie rozniosły ją pasożytujące na zamieszkujących ówczesne statki handlowe szczurach śniadych pchły. Szacuje się, że szerząc się w Europie i okolicach Morza Śródziemnego, przyczyniła się do śmierci (w zależności od szacunków) 30–60% ówczesnej populacji Europy, ogólnie zaś przyczyniła się do spadku ogólnoświatowej liczebności ludzkiej styl do poprawy] z 450 milionów do 350–375 milionów w XIV wieku.





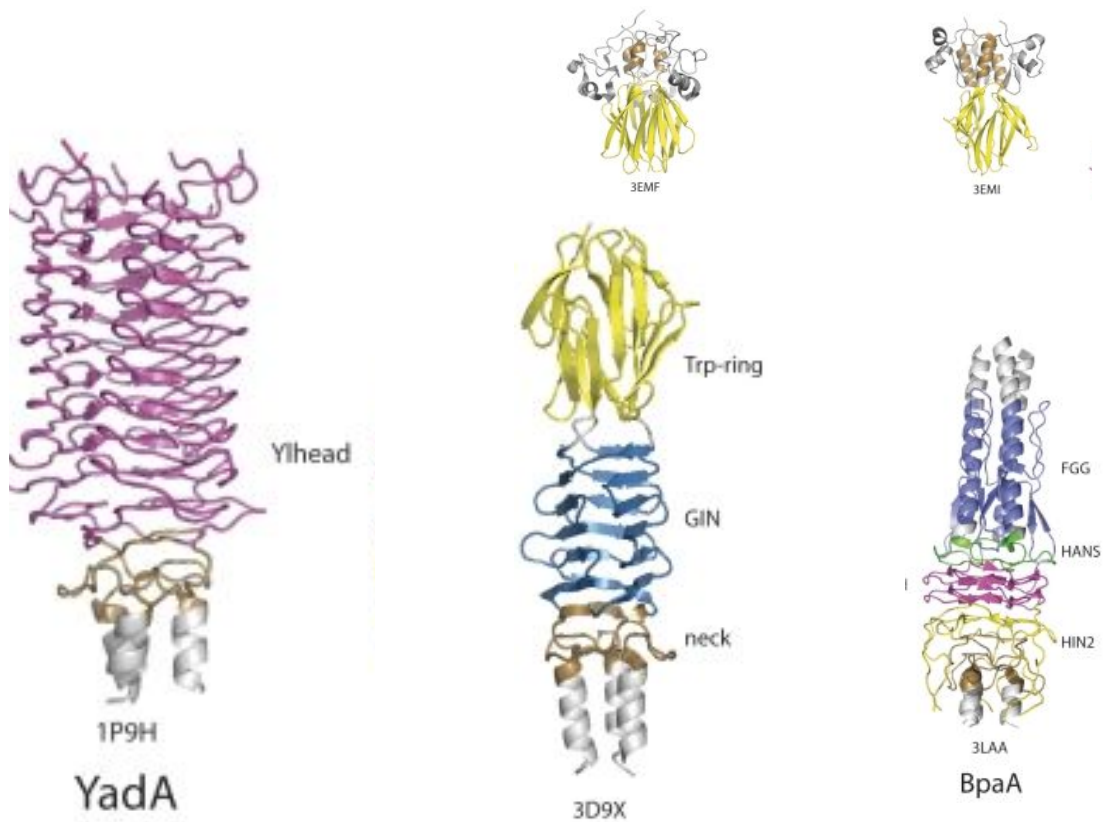
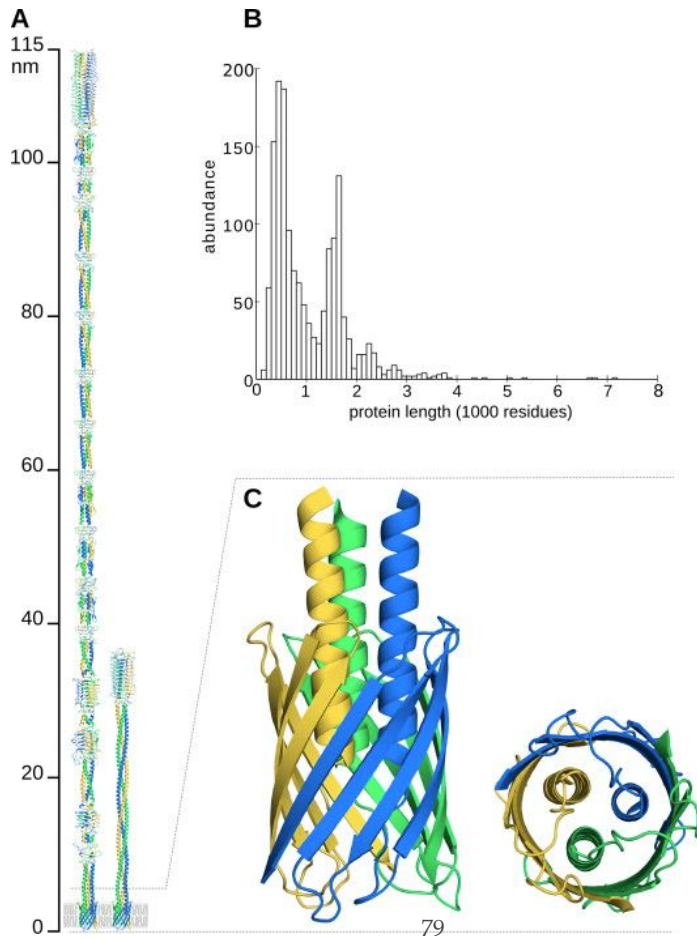
77

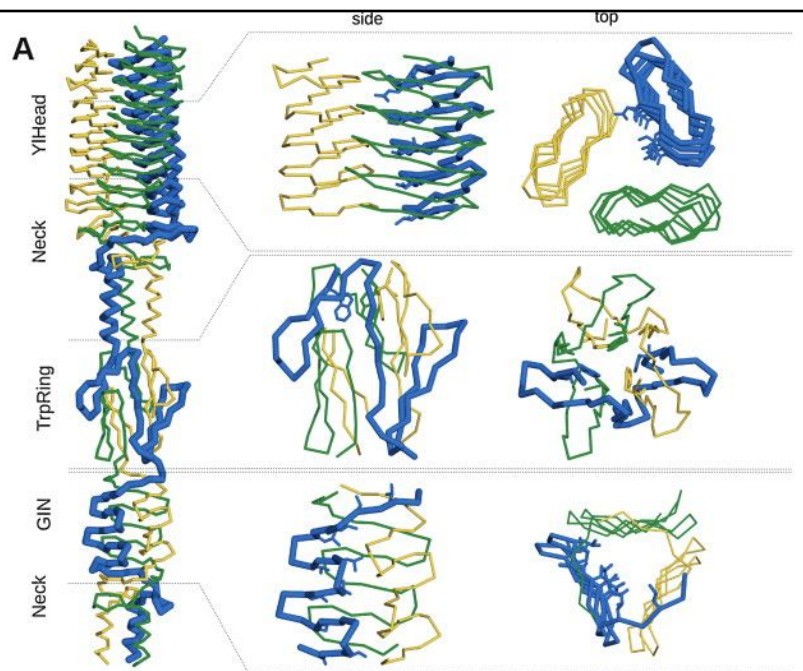
## YadA

- 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.



78



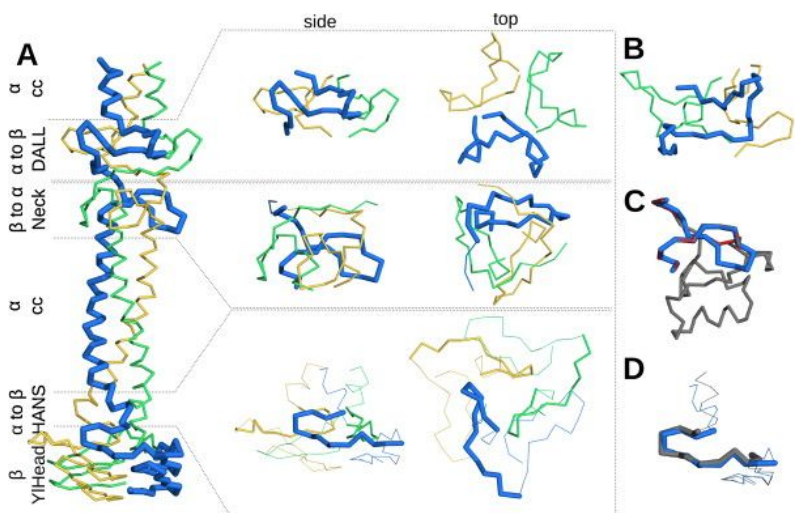


**B**

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$
>TrpRing	GWVVSad -gn eYsdgVK NA	NEVkFkG- egG AtVsGKTd	dG vRtITVdV-		
>FxB	GLkFaGn dGt --vihkK LG	eTLtIkGG atd atklsd--	nN ---Igvvad		
>GANG	-----	-----	KTtVtaG- kNi tVTstTna	DG	stIytVaTa

**C**

YlHead			GIN
outer	inner		
	...		
⌊	akAsgdn svAiGnn	⌊	-KDlt1-
⌊	akAsgdn svAiGnn	⌊	-dSVtGD
⌊	akAsgdn svAiGnn	⌊	-vvLnn-
⌊	akAsgdn svAiGnn	⌊	-tGLTtk n
⌊	akAsgdn svAiGnn	⌊	GSITa-
⌊	akAsgdn svAiGnn	⌊	-sGINAG



**E**

	h	ssss	ssssss	s
>DALL1	aAVkYDkndGvny-----	nsVTLGGgn-gtp		
>DALL2	DALLWdeta-----	gAFsAsHGgtnSK		
>DALL3	DgLVqQd-----	gtglITIGketgGteIniAnkdGarR		

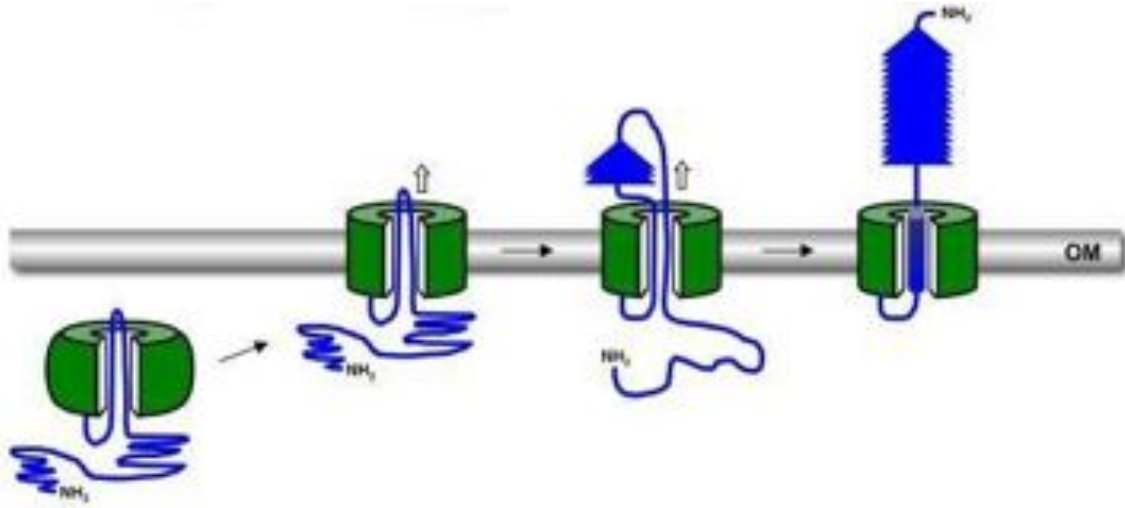
**F**

	sbb	ss	hhhh
>short	ItNVaaG-----	tadTDAVNvGQL	
>YV	ITNVadP-----	tddtDAvNKkYV	
>long	ItNVaaGdis-----	atSTDAVNGSQL	
>insert 1	VTNVtSGLkkYGnaNfdalnsatdltkqvDdAYkGLlNLnEKgagktplVADNTAATVGDl		
>insert 2	ITNVASGLkgagvls-datg-----	dvLnNAANVGDl	
>KG	-----	kTsvikpknGklvtgktannattdtNkGsGlVTGNtV	

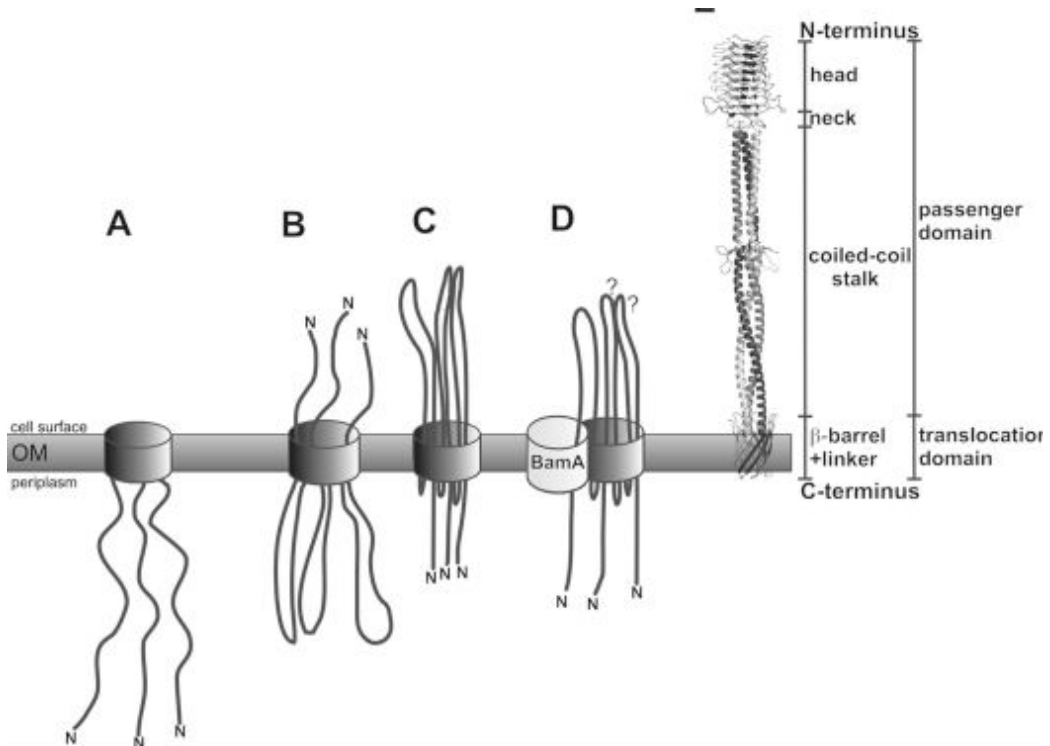
**G**

	cc	HANS	YlHead
	hhhhhhh	sssssss	sss sss
>HANS	consensus	GsTKYFHANSTeAd	
>SadA	1226-1239	IGDIVtT GSTKYFKTNTDGAD	ANAQGADSVaIGSG
>BpaA PDB 3laa	84- 117	IDNINAN G- IKYFHANSTDPD	SVATGtNSVaIGPN

# Typ V - autotransportery mechanism



83

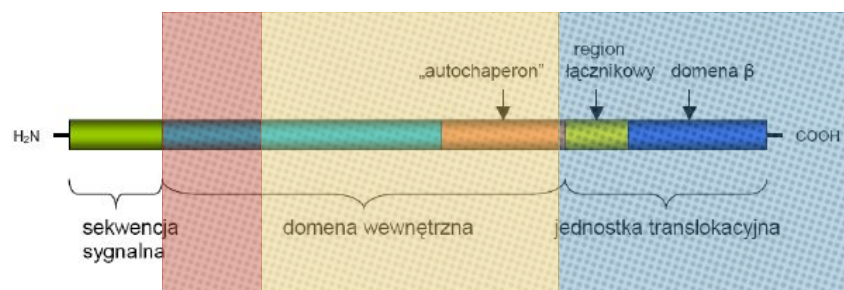


84

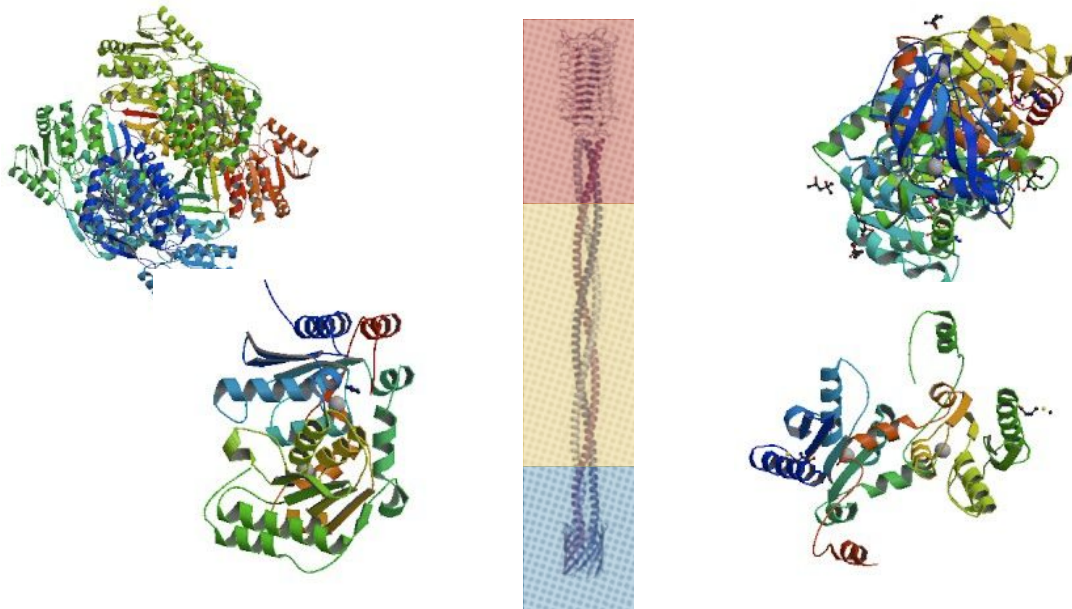
# Bacterial display

- 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

85



86



87

## Problemy...

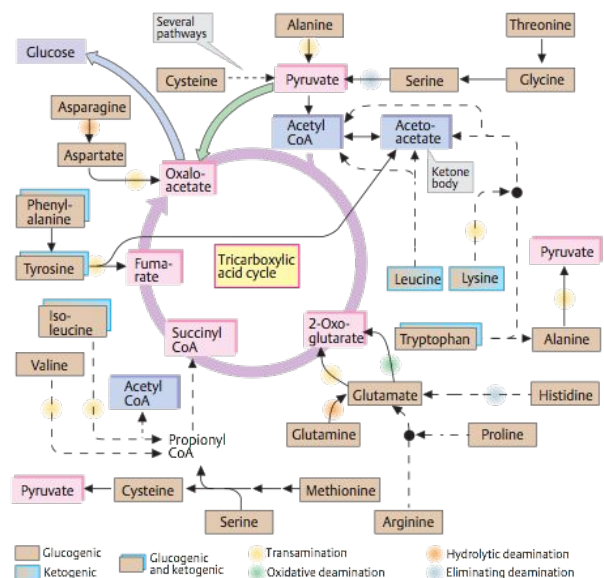
- TAA (trimeric autotransporters adhesins)
- Mechanizm transportu - synchronizacja
- Konfiguracja domeny katalizatora

88

# Transaminazy

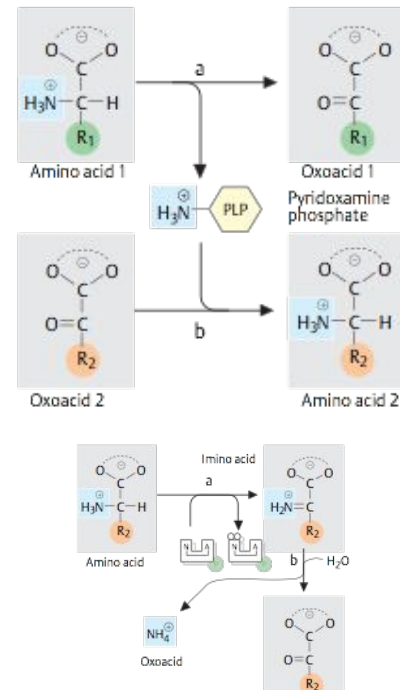
# Deaminacja amino kwasów

- Metabolizm amino kwasów wymaga przede wszystkim możliwości manipulowania grupą  $\text{NH}_2$ .



# Deaminacja amino kwasów

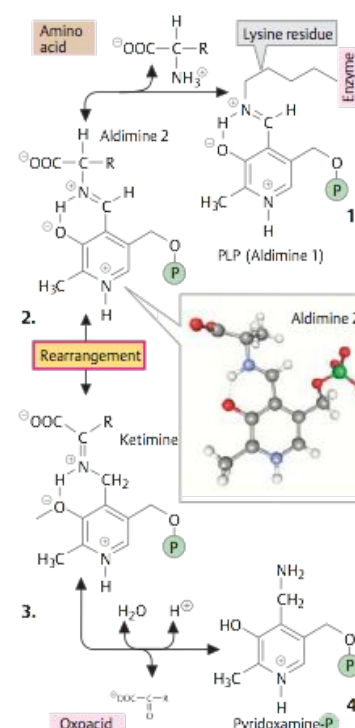
- Transaminazy katalizują zarówno anaboliczne jak i kataboliczne przemiany w łańcuchu metabolicznym aminokwasów.
- Przemiany te mogą zachodzić na drodze:
  - transaminacji
  - deaminacji oksydacyjnej



91

# Transaminacja

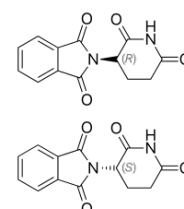
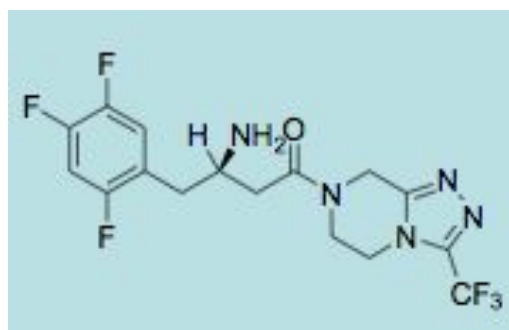
- Mechanizm składa się z trzech etapów:
  - w stanie spoczynkowym PLP związany jest z grupą NH<sub>2</sub> Lys enzymu
  - w obecności aminokwasu tworzy się addukt PLP-aminokwas, aldimina lub zasada Schiff'a, który chwilowo wypiera Lys
  - w wyniku przegrupowania i hydrolizy uwalnia się 2-okokwas oraz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



92

# Znaczenie przemysłowe

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



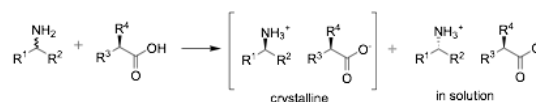
Thalidomide

93

# Otrzymywanie czystych izomerów

- Ko-krystalizacja z chiralnymi aminokwasami.

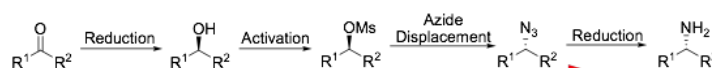
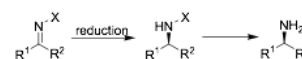
PROBLEM: utrata 50% materiału!



- Aminacja redukcyjna.

PROBLEM:

- kłopotliwe otrzymywanie materiału wyjściowego
- usunięcie podstawnika X



94

# Potencjał transaminaz

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

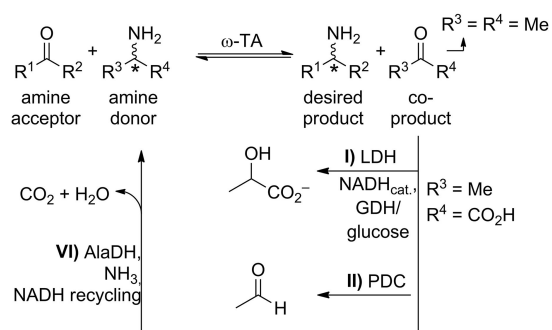
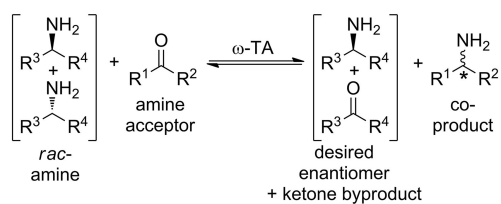


Jmal

95

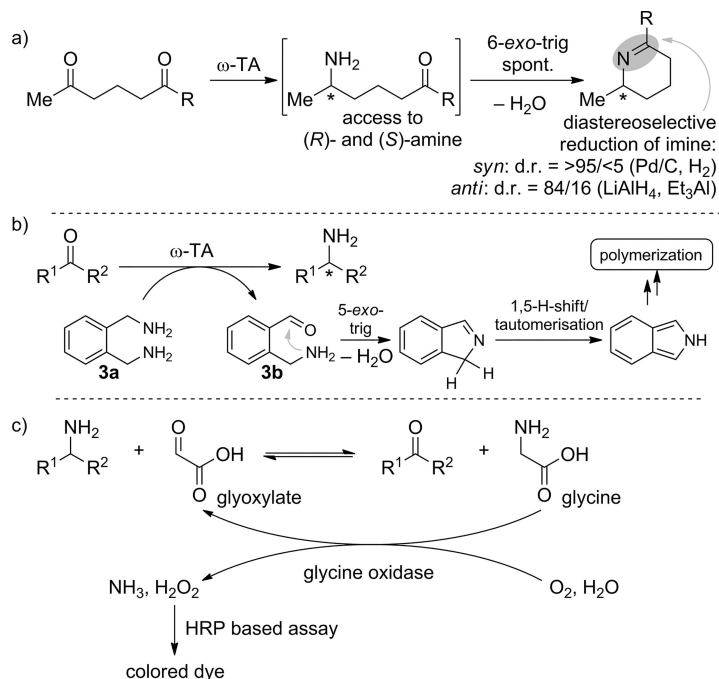
# Strategia wykorzystania TA

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



96

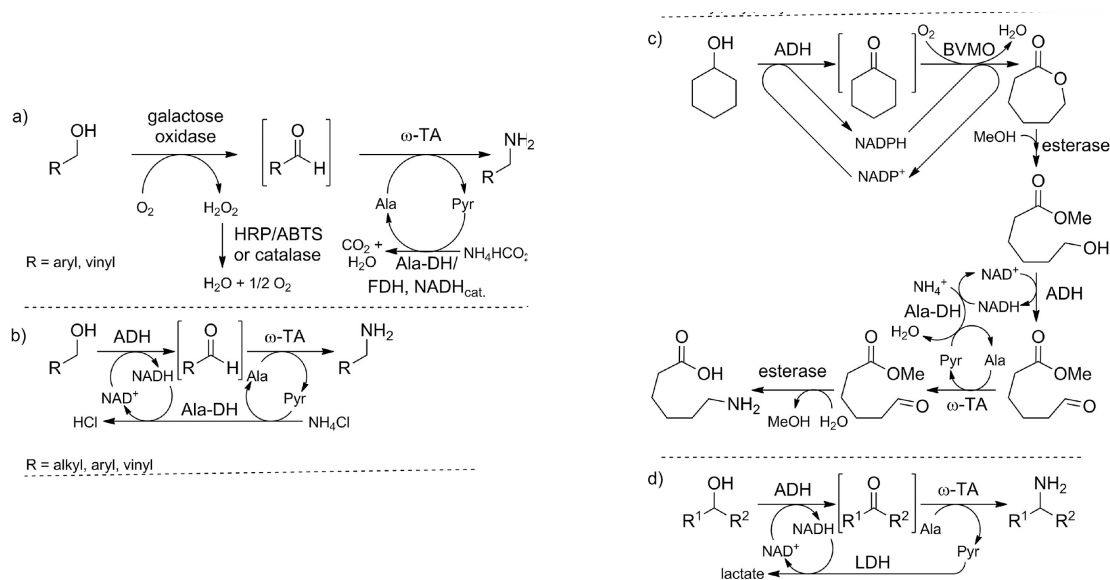
# Strategia wykorzystania TA



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

97

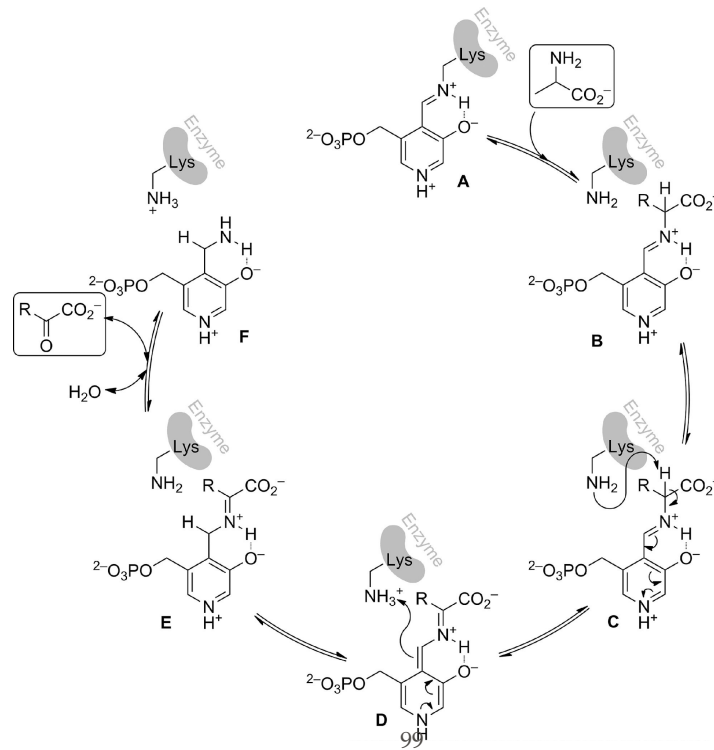
# Strategia wykorzystania TA



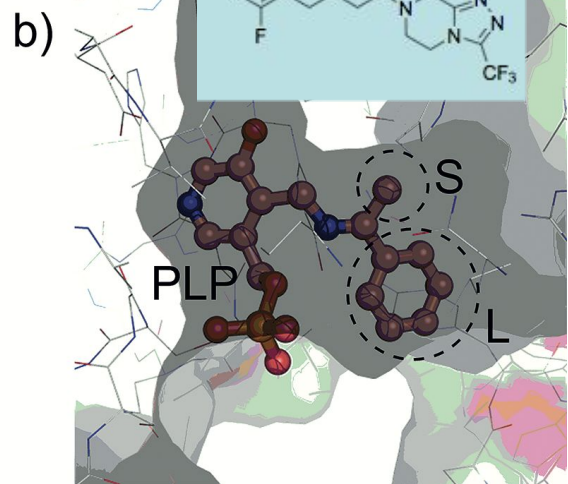
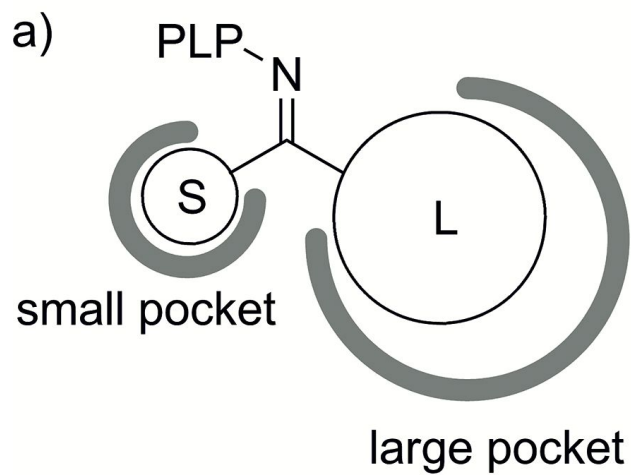
DH = alanine dehydrogenase. ADH = alcohol dehydrogenase. NAD<sup>+</sup>/NADH = nicotinamide adenine dinucleotide cofactor (oxidized/reduced form). BVMO = Baeyer-Villiger monooxygenase. NADP<sup>+</sup>/NADPH

98

# Mechanizm TA



# Miejsce aktywne



a) Schematic view of the binding site.

b) Active site of the  $\omega$ -TA from *Pseudomonas putida* with pre-optimized, docked substrate-PLP complex [PDB entry 3a8u].