

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – I

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejlesztése:

I. A törzs kialakítása

- 1) A molekula megismerése (aminosavsorrend, szénhidrátok)
Glikozilálás
- 2) Megfelelő analitika kidolgozása
- 3) Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról
- 4) Kodonoptimalás
- 5) A génszerelvény összeállítása (promóterek, operátorok, célgén, kísérő fehérjék, terminátor)
- 6) Klónozás, expresszió, szelekció – RCB létrehozása

II. Technológia kialakítása

- 1) Upstream optimalás (fermentációs körülmények)
- 2) Downstream optimalás (végtermék izolálása)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

1. A fehérje molekula megismerése

- Az aminosav sorrend elemzés (MS – MS)
- A glikozilációs mintázat elemzése (MS – MS)
- A másodlagos/harmadlagos szerkezet felderítése (legalább a diszulfid hidak), (Röntgen-kristallográfia)
- Domén-szerkezet, természetes érési/aktiválási útvonal
- Aktiváló/inaktiváló hatások, bomlékonyság



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

2. Analitikai módszerek kidolgozása

- Az analitika a „szemünk”, amivel követhetjük a fejlesztés minden lépését
- Ha nincs jó analitika az elején, akkor később derülnek ki a hibák – buktuk az egész addigi munkát.

Lehet:

- Szerkezeti: - enzimmel célzottan feldaraboljuk a fehérjét és a kis peptideket HPLC-vel vizsgáljuk
- MS-MS
- Aktivítási: immunanalitikák



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Példa: inzulin analitika

A rekombináns inzulin azonosítása (azonos-e mindenben a humánal):

Kémiai analízis: HPLC

- egészben
- enzimesen (V8 proteáz ötfelé hasítva (fingerprinting))
- aminosav-analízis (teljes hidrolízis után)

Biológiai hatás: - vércukorszint csökkenés nyúlban (lassú, drága)

Immunanalízis: - reakció specifikus ellenanyagokkal



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

3. A gazdaszervezet kiválasztása

Lehet:

- Prokariótákkal (baktériumokkal)
 - Könnyen, gyorsan szaporíthatók, olcsó táptalaj, de:
 - a termék sokszor intracelluláris (zárványtest), és nincs poszttranszlációs modifikáció (glikozilálás, metilezés)
- Élesztőkkel
 - Gyors szaporodás, jó hozam, olcsó táptalaj, de:
 - eltérő glikozilációs mintázat, nem mindig aktív a termék
- állati sejtenyészettel
 - Lassú szaporodás, drága tápoldat, kényes fermentáció, kisebb koncentráció, de:
 - termék biztosan biológiailag aktív.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

3. Gazdaszervezetek összehasonlítása

	Alacsony		Magas
Előállítás sebessége	MAMMALIAN	BEVS/INSECT CELL	YEAST
Techn. költsége	BACTERIA	YEAST	BEVS/INSECT CELL
Tipikus hozam	MAMMALIAN	BEVS/INSECT CELL	BACTERIA
Post transl. módosítás	BACTERIA	YEAST	BEVS/INSECT CELL
Hatóság által már jóváhagyott technológiák	BEVS/INSECT CELL	YEAST	BACTERIA

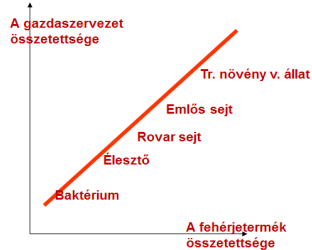


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

3. Gazdaszervezetek összehasonlítása

Minél komplexebb a célfehérje, annál fejlettebb gazdasejtet kell választani.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

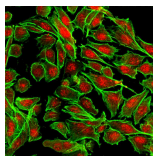
3. A gazdaszervezet kiválasztása

A jelenleg jóváhagyott technológiák 95%-a ezt a három gazdaszervezetet használja:

E. coli

S. cerevisiae

Chinese Hamster Ovary (CHO)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

3/1 Glikozilálás

Az eukarióta szervezetek különböző szénhidrát-mintázatokat hoznak létre:

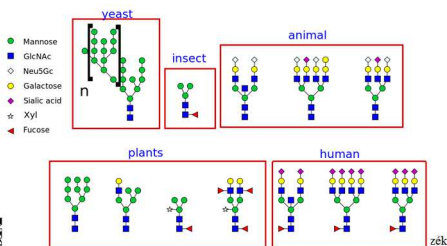
Baktériumok: nincs

Élesztők: sok mannóz egység

Rovarak: rövid, fukozilált

Emlős sejtek: komplex „kétágú”

Növényi sejtek: fukozilált és xilozilált



9

A glikozilálás típusai

A cukorrészek az aminosav lánc elkészülte után kerülnek rá a molekulára. Ez csak bizonyos funkciók csoporttal rendelkező aminosavakon lehetséges:

- N-glikozilálás → az Asn-X-Ser/Thr/Cys aminosav-hármas nitrogénjén, ahol X bármely aminosav lehet.
- O-glikozilálás → Ser vagy Thr-on.

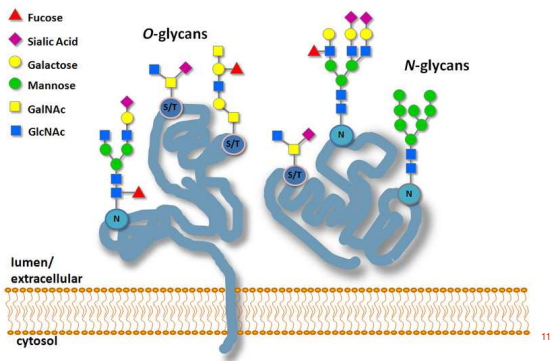
A két glikozilálás más biokémiai mechanizmussal történik, más helyen a sejten belül.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

N- és O-glikoziláció



N-glikozilálás

A fehérjékben előforduló Asn-X-Ser/Thr egységeknek mintegy kétharmad részéhez kapcsolódik cukorrész. A továbbiak sztérikus okok vagy az X aminosav savas jellege miatt fedetlenek maradnak.

A fehérjék szénhidrát részeik kialakulása során hosszú utat tesznek meg a sejten belül. A riboszómáról az ER lumenjébe kerülnek, onnan transzport vezikulákban végig haladnak a Golgi komplex cisz-, médium- és tranz rétegein és csak ezután kerülnek a felhasználási helyükre.

Az útvonal minden állomásán lokalizált enzimek végeznek egy-egy átalakítást az oligoszacharidokon.

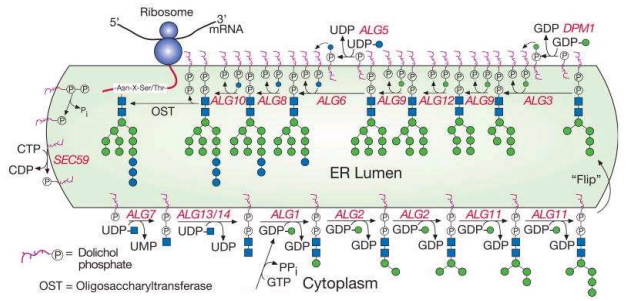


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

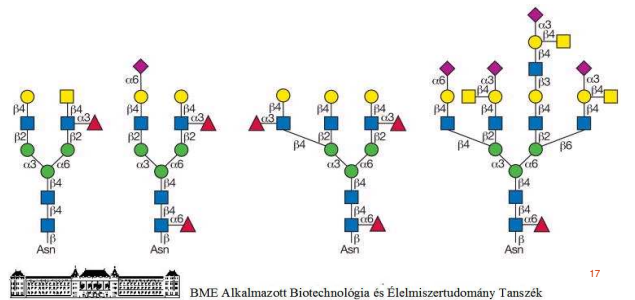
A 14-oligoszacharid bioszintézise

Az első hét egység beépülése az ER külső felületén történik, aztán „befordul” a lumenbe és ott folytatódik.



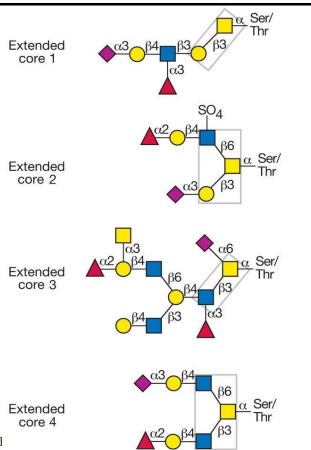
Reakciók a Golgi komplexben

A bemutatott fő szintézisút végén a galaktóz láncvégű oligoszacharidok sokféleképpen „dekorálhatók” tovább:



O-glikozilálás

Az O-glikozilálásuk egész más mechanizmussal mennek végbe. A kész fehérjelánc megfelelő OH csoportjára egyenként kapcsolódnak a cukrok UDP-aktivált formában. Az alap ez esetben az N-acetil-galaktózamin kötése és ehhez kapcsolódik egy galaktóz és/vagy egy N-acetil-glükózamin. Erre az elágazó trisacharidra épülhet még sokféle, változatos felépítésű cukor.



Példa: az EPO harmadlagos szerkezete

... 4 antiparalel lefutású α -hélixből áll:

◆ Sialic acid
▲ Galactose ● Fucose
● Mannose ■ Glucosamine

19

EPO izoformák

Az EPO molekulák maximálisan 14 szílsavat tartalmazhatnak. Ezek száma szerint többféle izoformát különböztethetünk meg:

EPO Carbohydrate

3 N-linked chains	1 O-linked chain	Isoform (No. of Sialic Acid residues)
(3 circles)	(1 circle)	14
(3 circles)	(1 circle)	13
(3 circles)	(1 circle)	12
(3 circles)	(1 circle)	11
(3 circles)	(1 circle)	10
(3 circles)	(1 circle)	9

○ = Sialic Acid

The structure of the carbohydrate chains is variable

↓

Isolate molecules based on sialic acid content
Test the isolated EPO isoforms for biological activity

Figure 1: Schematic of EPO Carbohydrate Structure and EPO Isoform Designation. EPO = erythropoietin.

EPO izoformák

A különböző EPO izoformák hatékonysága (a hematokrit növekedése) arányos a szílsavak számával.

Isoform	Increase in Hematocrit - Day 30
8	~6
9	~10
10	~14
11	~18
12	~20
13	~23
14	~26

Figure 2: In Vivo Efficacy of Isolated EPO Isoforms—CD-1 mice (n = 20/21)

4. Kodon optimálás

A genetikai kód redundáns, egy aminosavat több (2,4,6) triplett is kódol. Nem mindegy, melyiket használjuk, a szintézis sebességét befolyásolja:

- A tRNS-ek kópiaszáma és illeszkedése
- A mRNS legyen stabil és ne képezzen hurkokat
- A DNS szálak könnyű szétválasztása (G+C arány)

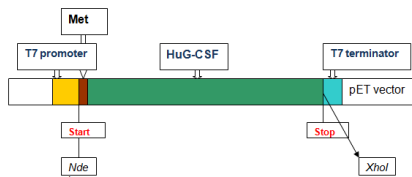
Ez minden gazdára más és más. Erre specializálódott cégek szoftvereivel optimálnak.



5. A konstrukció megtervezése

A célgén köré megtervezett vágási helyekkel „expressziós kazettát” építenek:

promóter-operátor-célgén-terminátor



Példa: az NdeI enzim vágáshelye (CA|TATG) megegyezik a metionin kódjával (ATG), a bacifehérjék első aminosavával



6. Génmanipuláció

1. Az optimált bázissorrendű DNS-t erre specializált cégekkel szintetizáltatják.
2. Kétszálúvá alakítják
3. Felszaporítják PCR-rel
4. Beépítik a kiválasztott vektorba (eukarióta host esetén ingázó vektor)
5. Génbevitel
6. Expresszió, szelekció