

Πρωτεϊνική Μηχανική

Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

ΕΠΙΣΗΜΗ ΣΕΛΙΔΑ: [HTTP://WWW.CHEMISTRY.UOC.GR/PAVLIDIS/](http://www.chemistry.uoc.gr/pavlidis/)

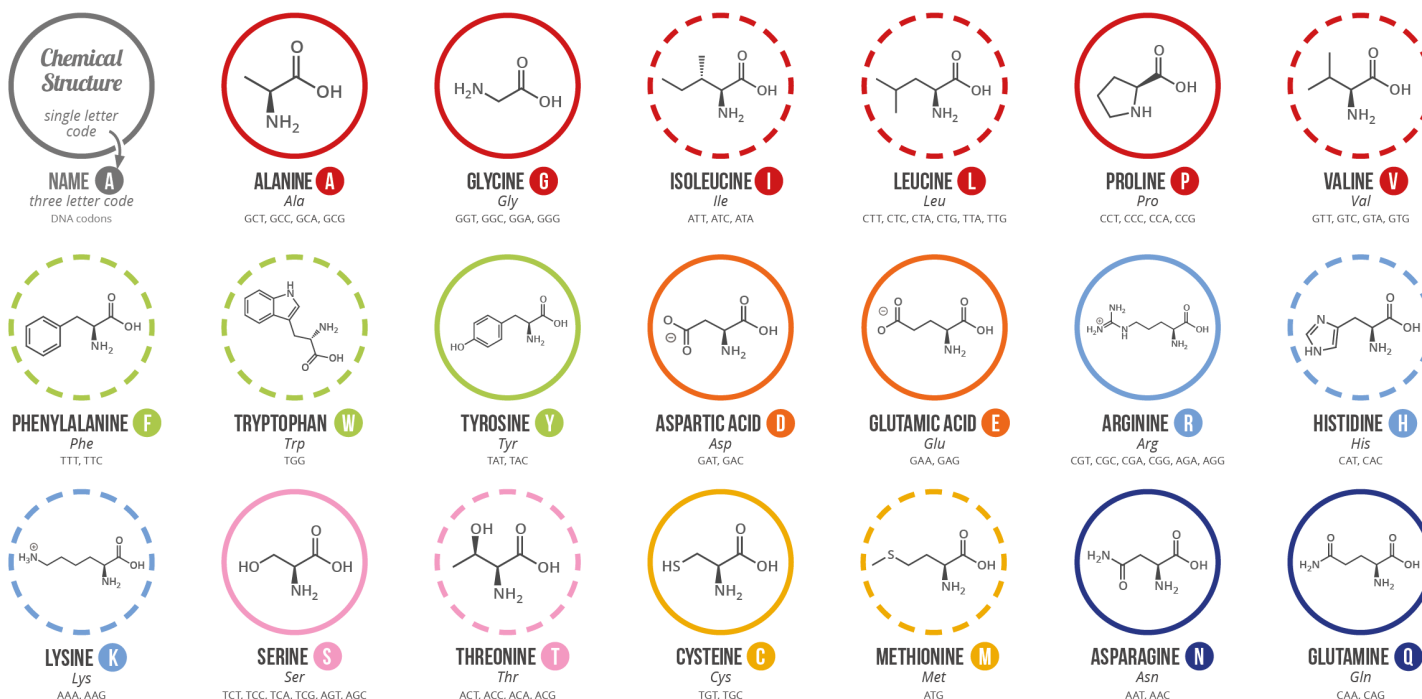
Ιδιότητες αμινοξέων και δομή πρωτεϊνών

Αμινοξέα στην πρωτεϊνοσύνθεση

A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. 'ESSENTIAL' AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.

Chart Key: ● ALIPHATIC ● AROMATIC ● ACIDIC ● BASIC ● HYDROXYLIC ● SULFUR-CONTAINING ● AMIDIC ○ NON-ESSENTIAL ○ ESSENTIAL

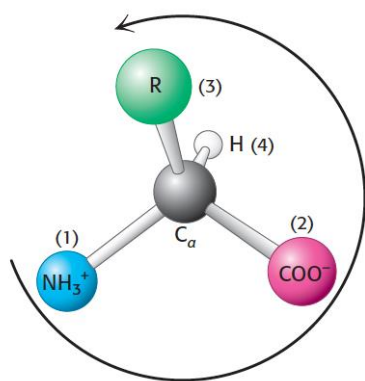


Note: This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asx (B) and glx (Z) are respectively used.

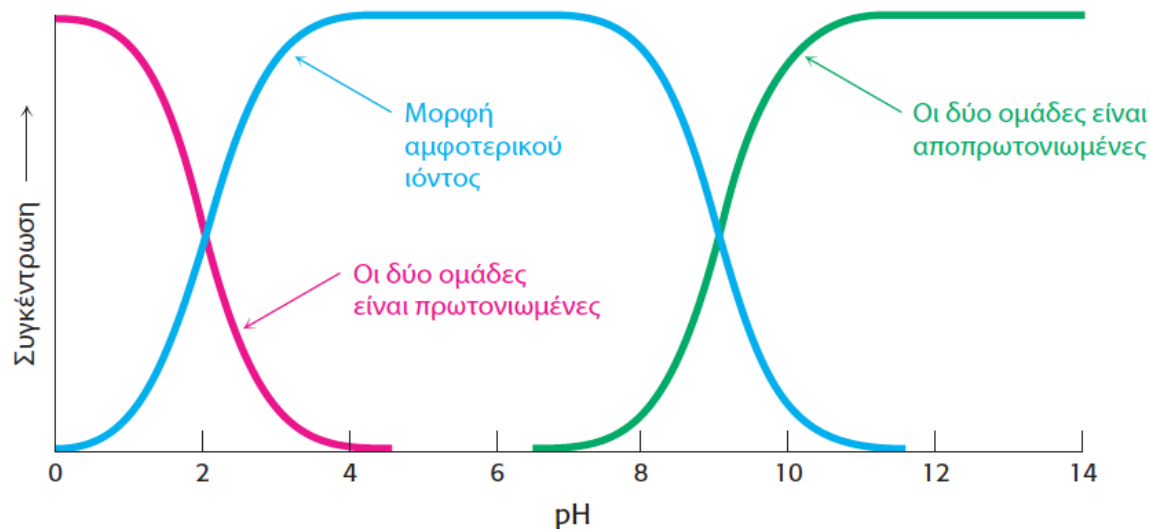
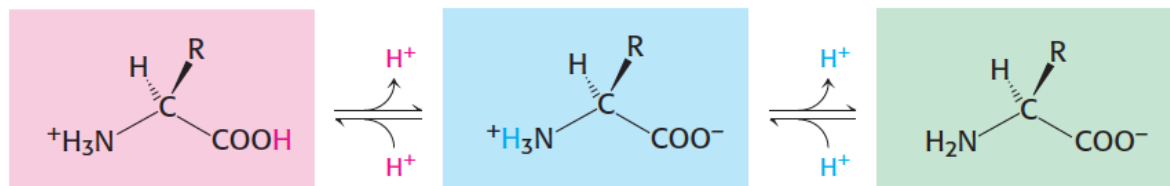
© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.



Ιδιότητες αμινοξέων

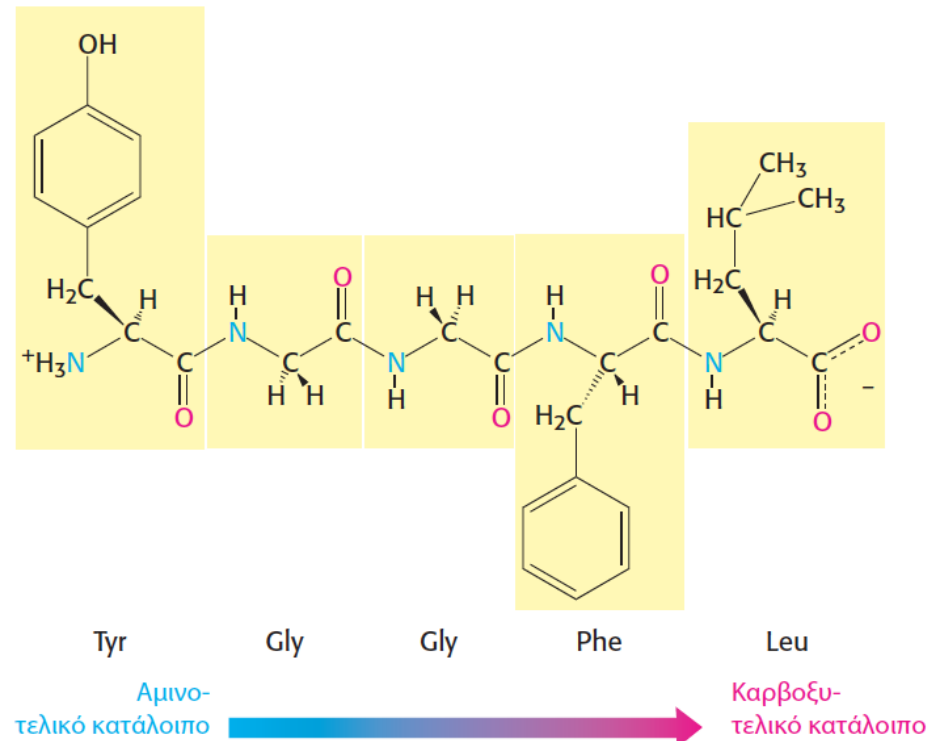
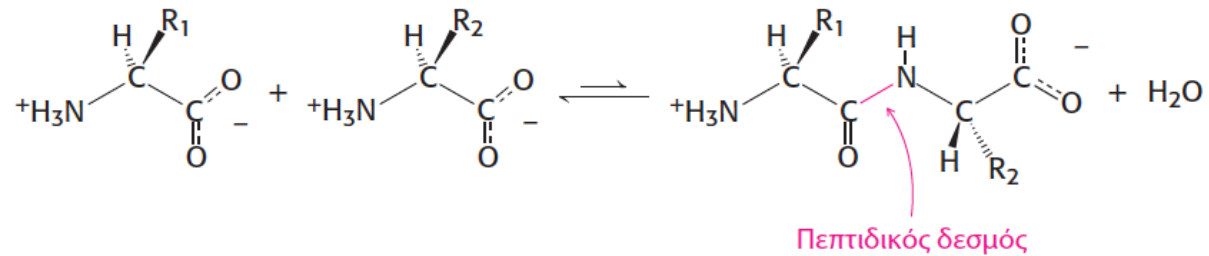
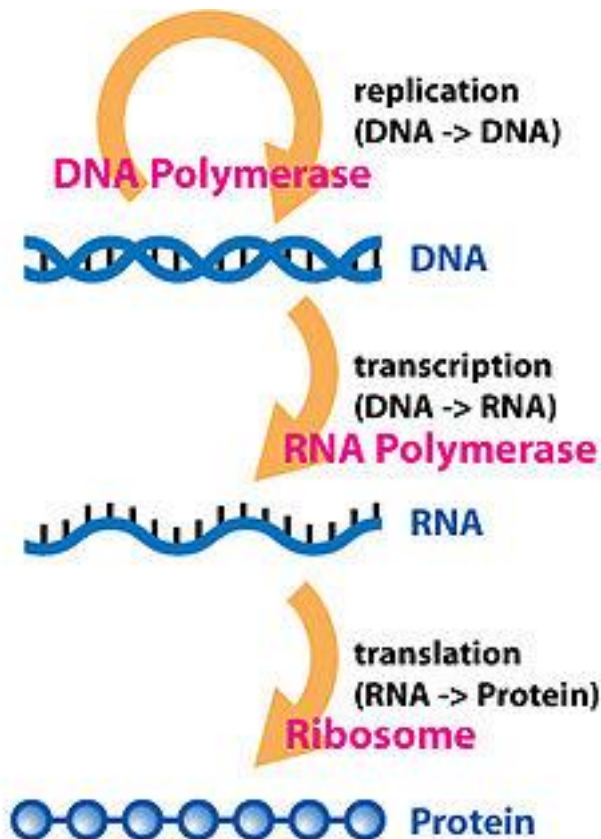


Μόνο L-αμινοξέα
στις πρωτεΐνες.



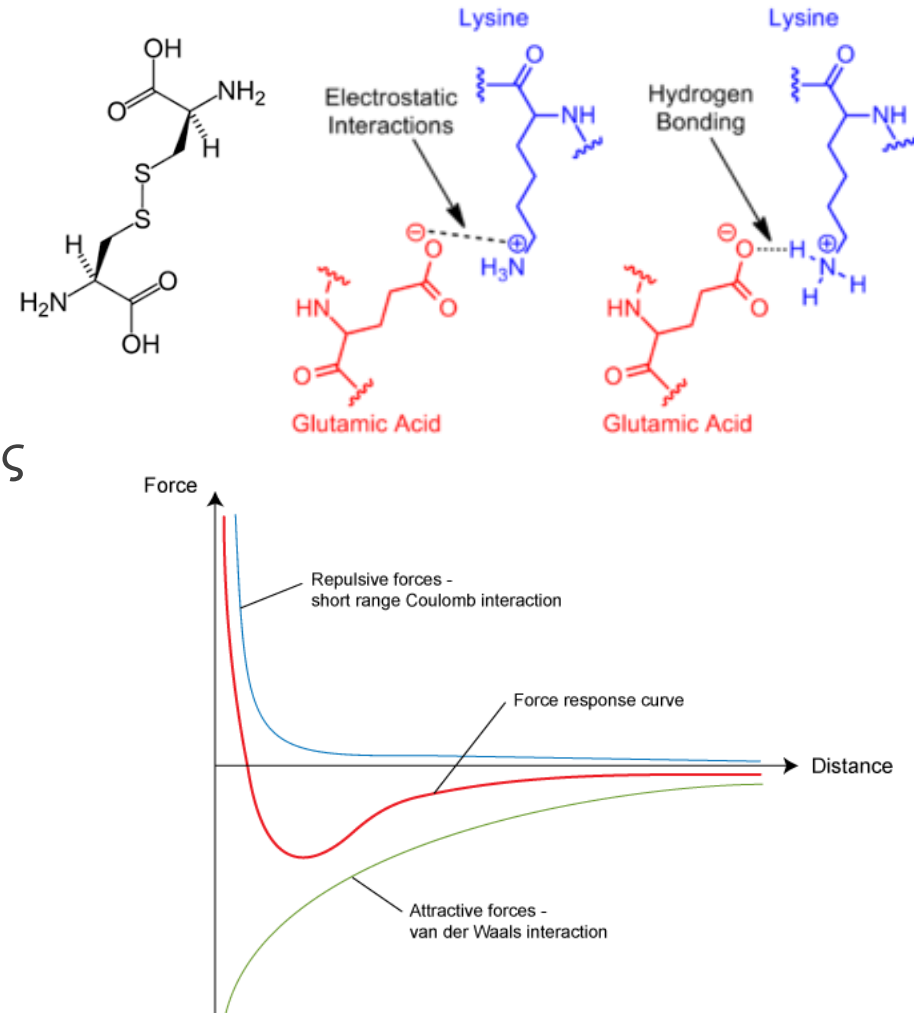
Η κατάσταση ιονισμού των αμινοξέων αλλάζει με το pH

Πολυπεπτιδικές αλυσίδες

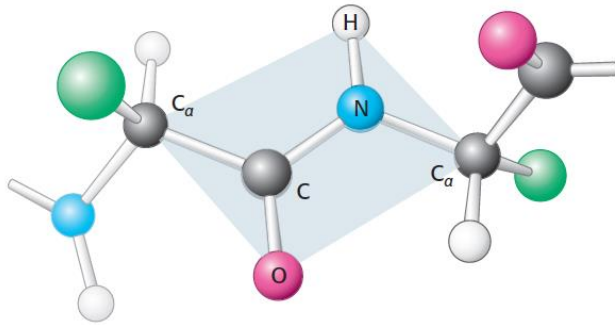


Φύση των δεσμών στα ένζυμα

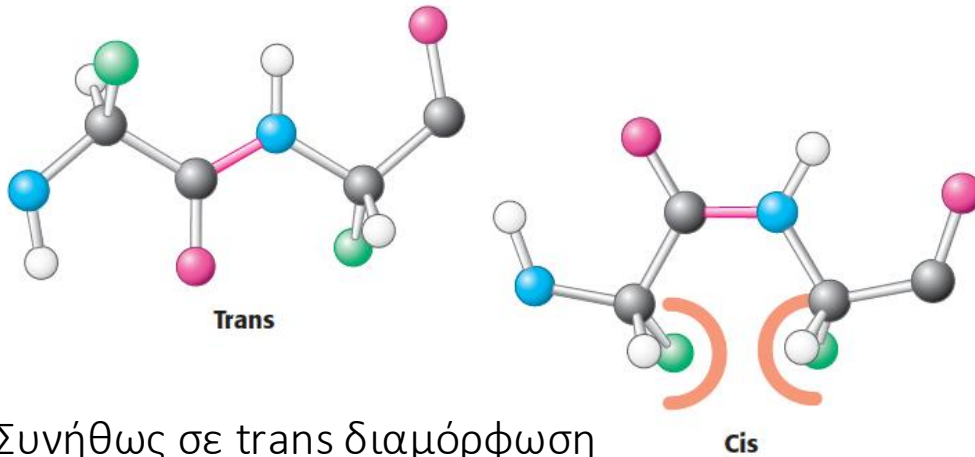
- ❖ Ομοιοπολικοί (π.χ. πεπτιδικοί)
- ❖ Δισουλφιδικοί δεσμοί
- ❖ Γέφυρες άλατος ή ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
- ❖ Δεσμοί υδρογόνου
- ❖ Van der Waals



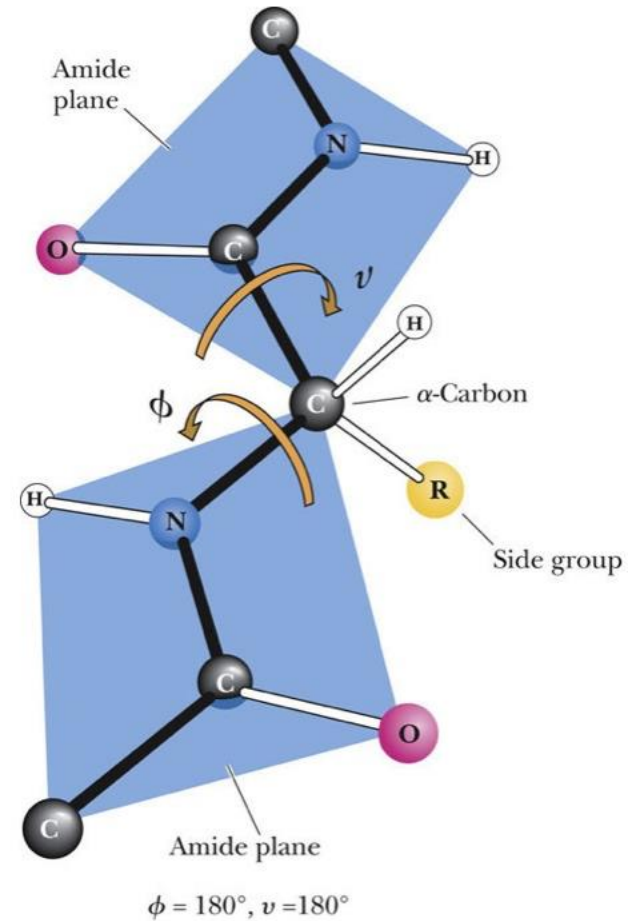
Γεωμετρία δεσμών



Επίπεδοι πεπτιδικοί δεσμοί



Συνήθως σε trans διαμόρφωση



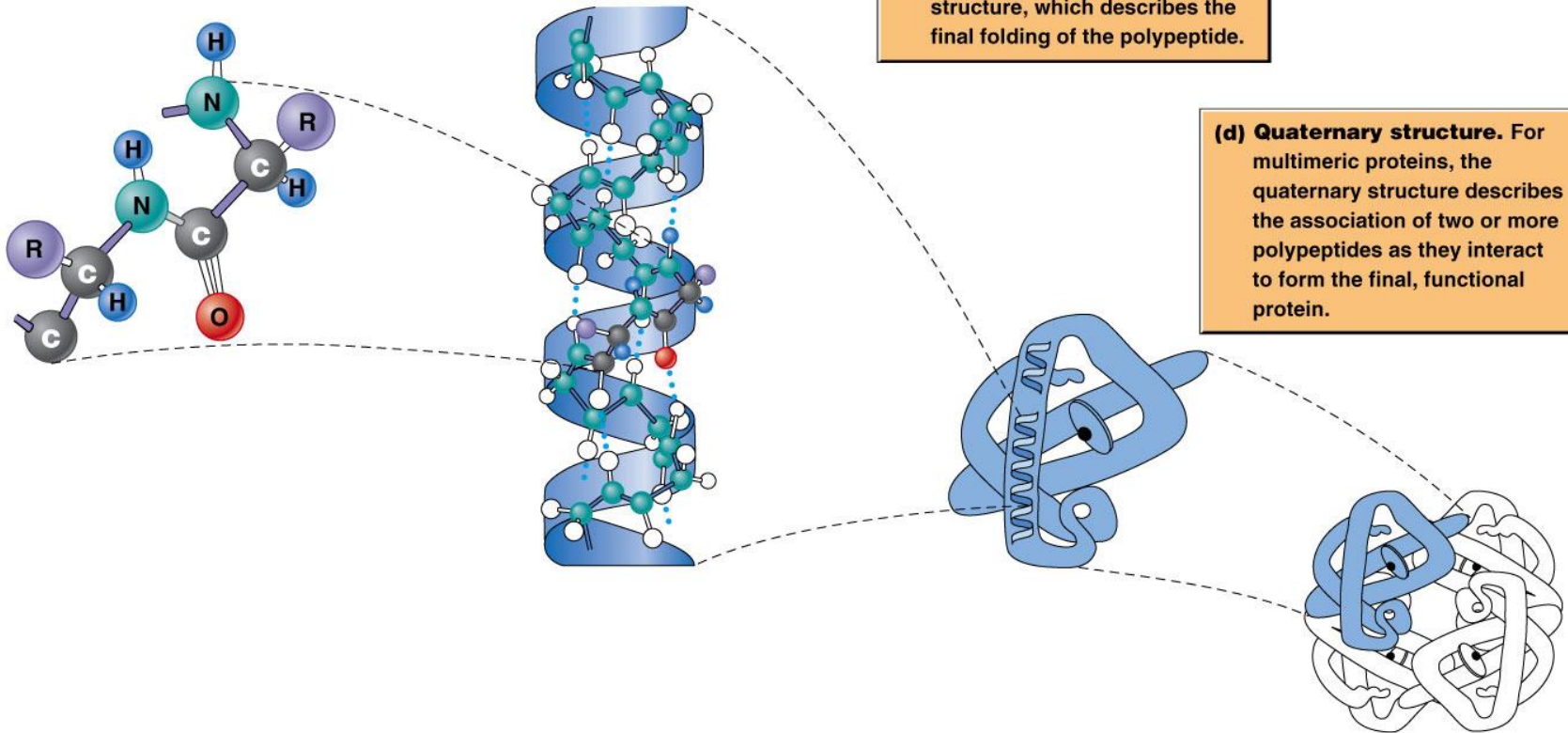
Δομή πρωτεϊνών

(a) Primary structure. The primary structure of a protein is a sequence of amino acids linked together by peptide bonds, forming a polypeptide.

(b) Secondary structure. Local regions of the resulting polypeptide can then be coiled into an α helix, one form of secondary structure.

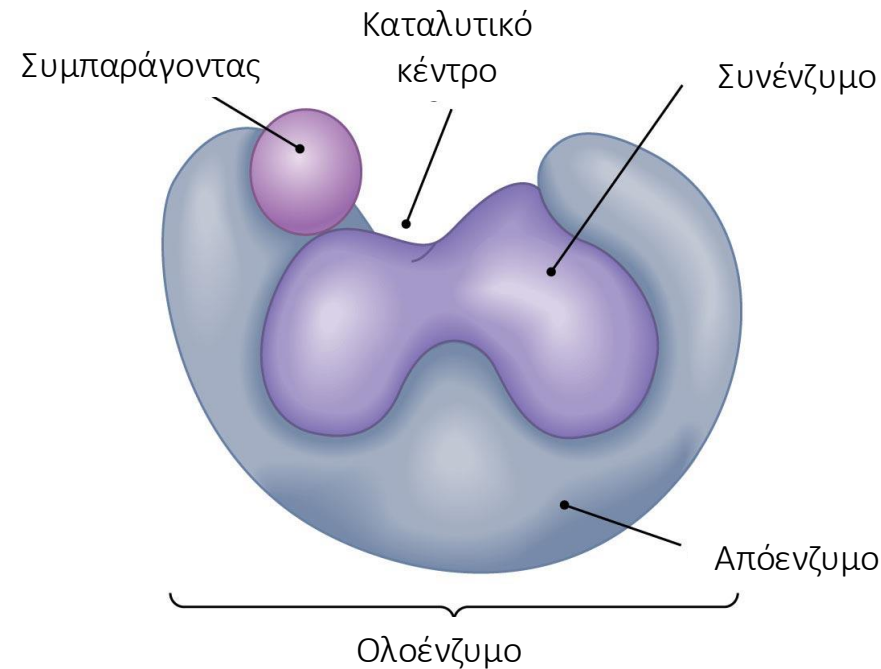
(c) Tertiary structure. Regions of secondary structure associate with each other in a specific manner to form the tertiary structure, which describes the final folding of the polypeptide.

(d) Quaternary structure. For multimeric proteins, the quaternary structure describes the association of two or more polypeptides as they interact to form the final, functional protein.

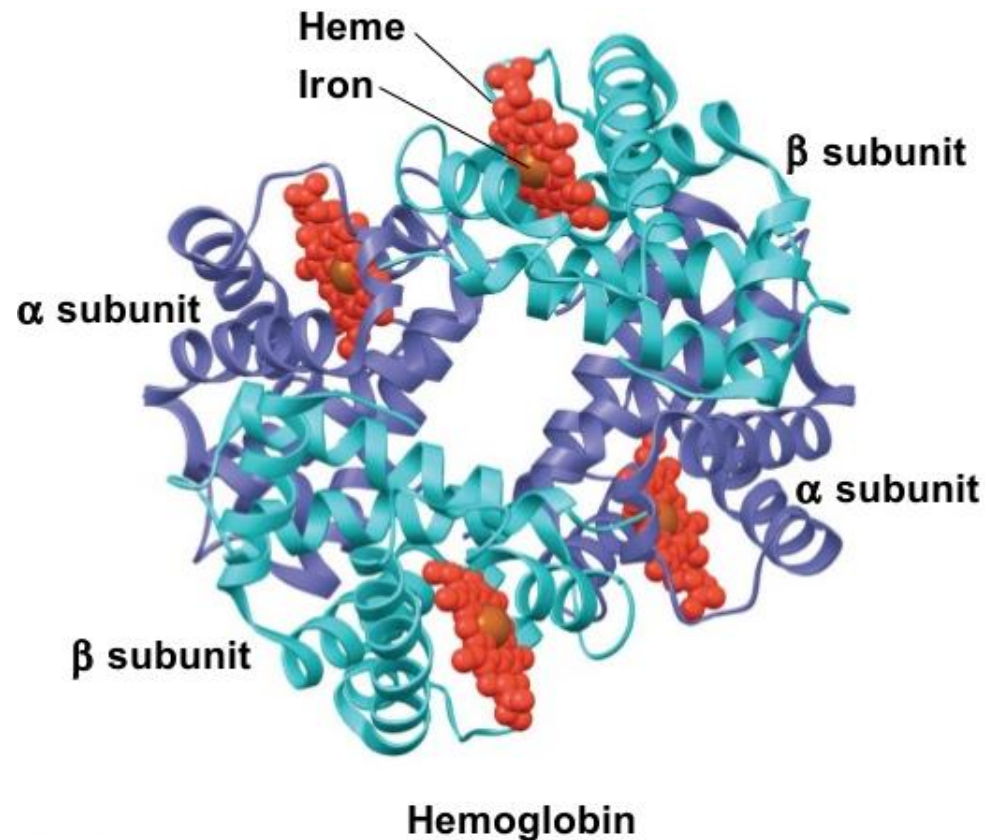


© 2012 Pearson Education, Inc.

Δομή πρωτεϊνών



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



Συμπράγοντας: συνήθως ανόργανος (μεταλλικά ιόντα)

Συνένζυμο: συνήθως οργανικό μόριο

Οι όροι συγχέονται στη βιβλιογραφία.

α -έλικα

Amino terminus

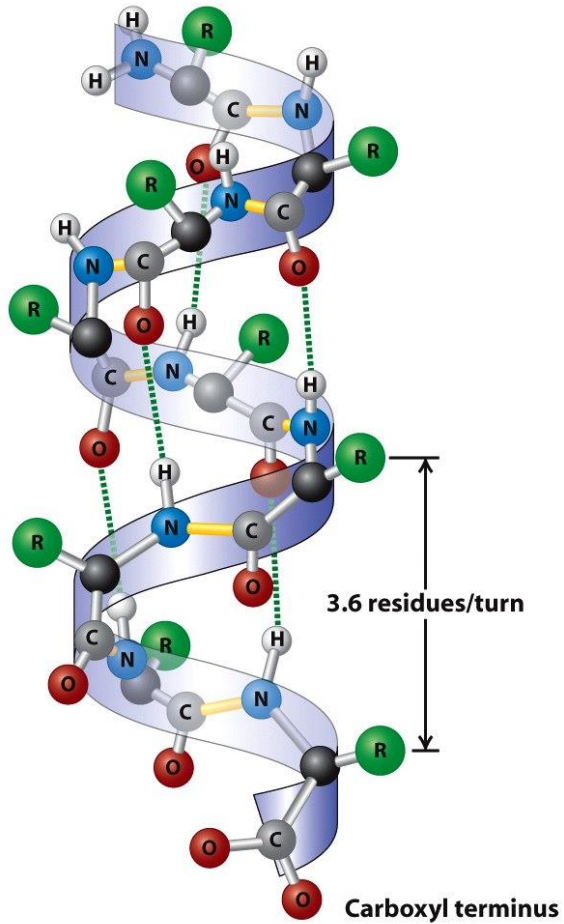
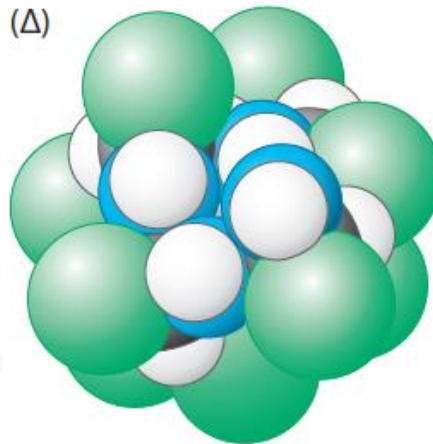
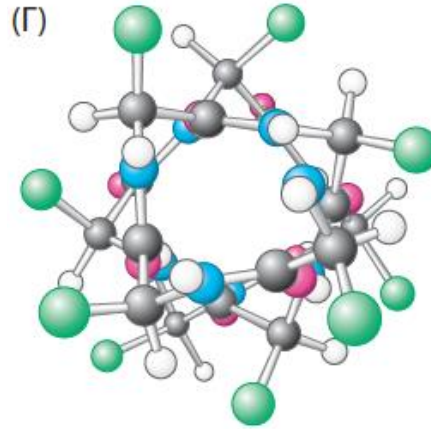
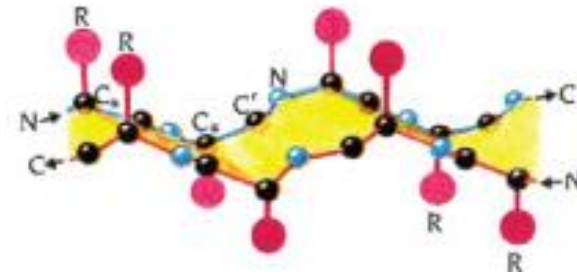
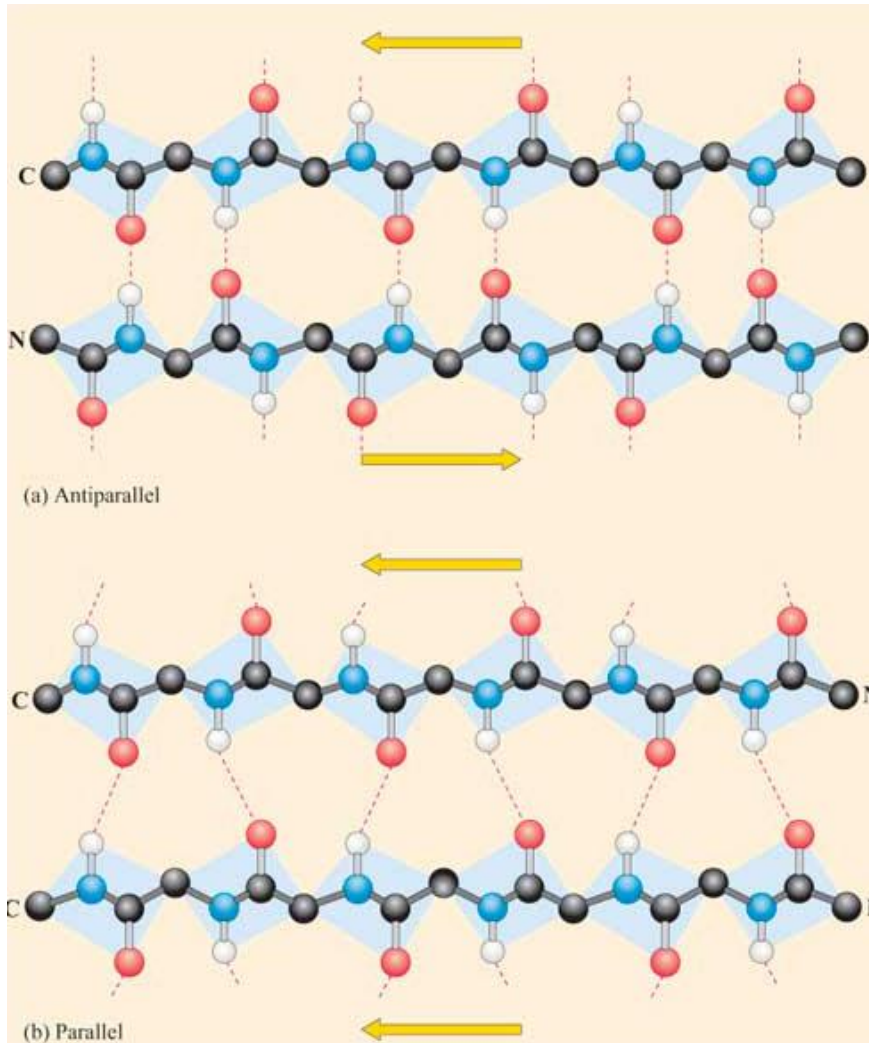


Figure 3-4
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

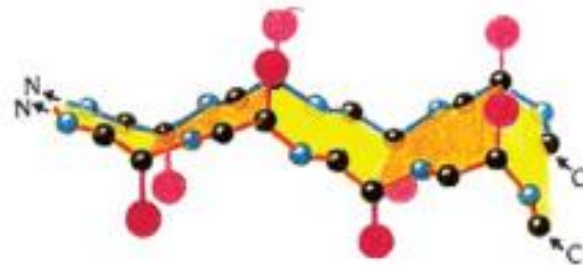


- ❖ 3.6 αμινοξέα ανά στροφή
- ❖ Σταθεροποίηση με δεσμούς υδρογόνου ανά 4 αμινοξέα
- ❖ Συνήθως δεξιόστροφη
- ❖ Οι πλευρικές ομάδες στο εξωτερικό
- ❖ Δυνατότητα αμφίφιλης έλικας

β -πτυχωτές επιφάνειες

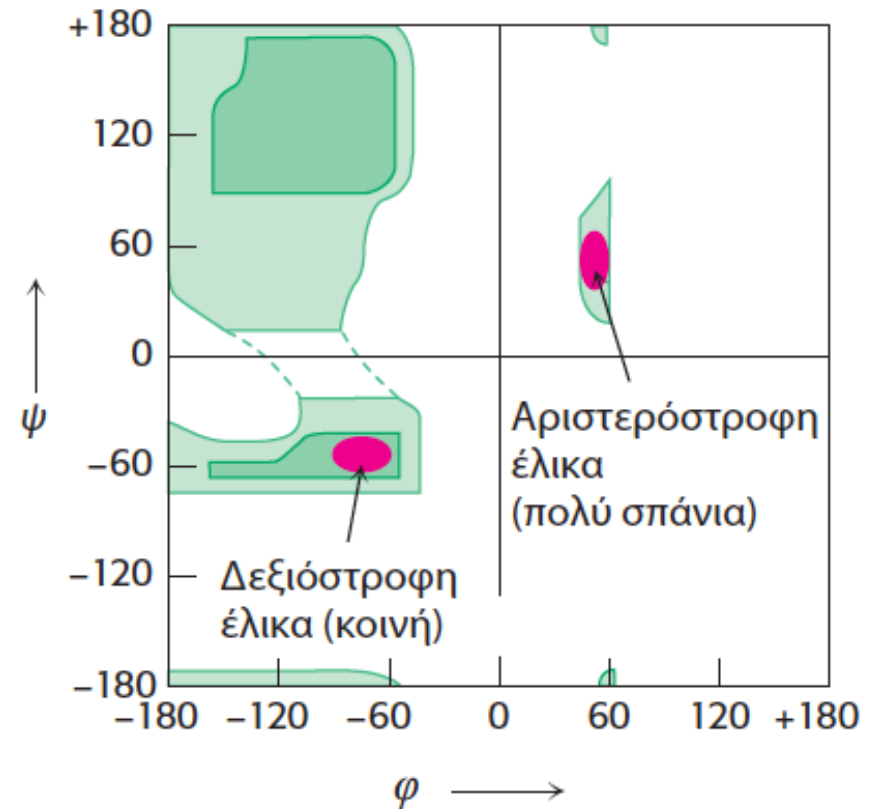


❖ Προτίμηση σε αντιπαράλληλες πτυχές



Διάγραμμα Ramachandran

- ❖ Τα αμινοξέα παίρνουν συγκεκριμένες διαμορφώσεις
- ❖ Έχουν συγκεκριμένους βαθμούς ελευθερίας
- ❖ Για τις α -έλικες υπάρχουν δύο διαμορφώσεις
- ❖ Κυρίως συναντάται η δεξιόστροφη έλικα σε πρωτεϊνικές δομές



[Βίντεο με εξήγηση \$\phi\$ και \$\psi\$ γωνιών και γιατί έχουμε επιτρεπτές περιοχές](#)

Πρωτεϊνική δομή και λειτουργία

Πρωτεϊνική **δομή**: προέρχεται από την **αλληλουχία**

Πρωτεϊνική **λειτουργία**: προέρχεται κυρίως από τη **δομή**

Γενική αρχή αναδίπλωσης σφαρικών πρωτεϊνών:

- κάλυψη των υδρόφοβων αμινοξέων στο εσωτερικό
- τα υδρόφιλα αμινοξέα μένουν στην επιφάνεια

Γενική αρχή αναδίπλωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών:

- δημιουργία τοπικά υδρόφοβων περιοχών

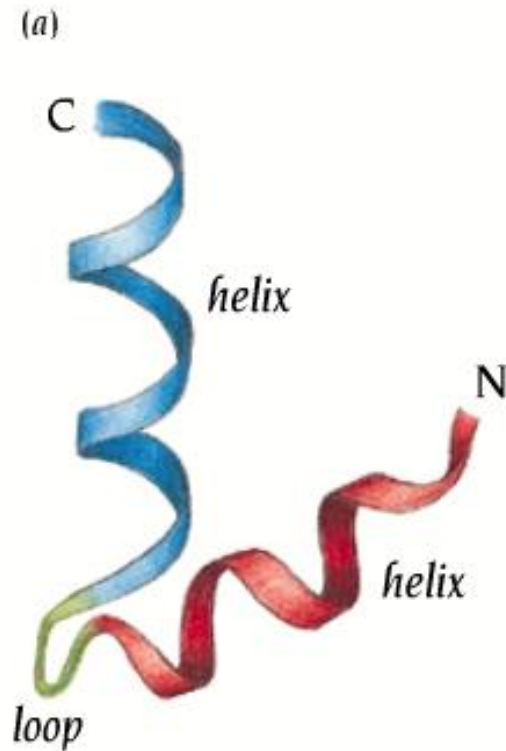
<https://fold.it>

Για κατανόηση του πως αναδιπλώνεται μία πρωτεΐνη

Δομικά μοτίβα

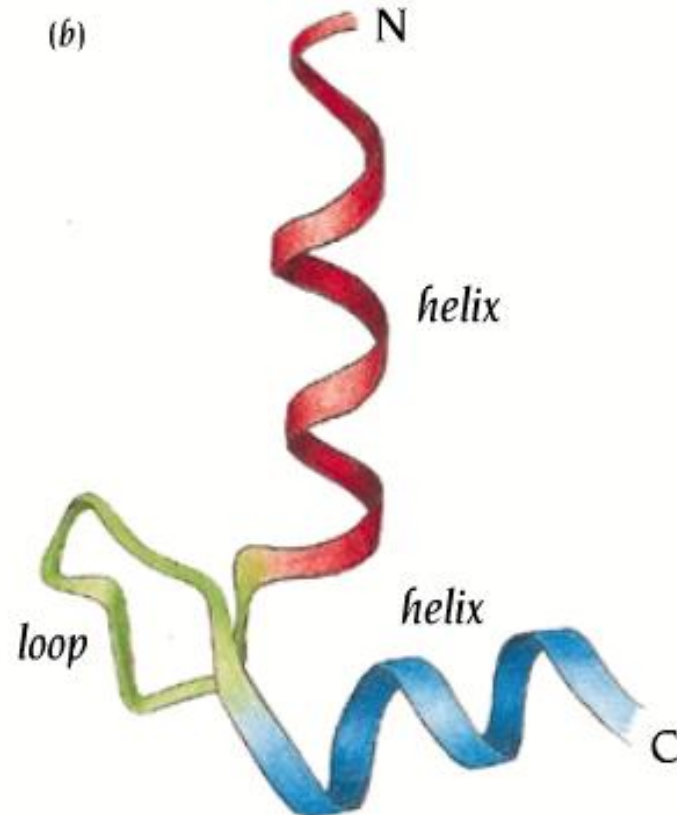
Helix-turn-helix

DNA binding



Helix-loop-helix

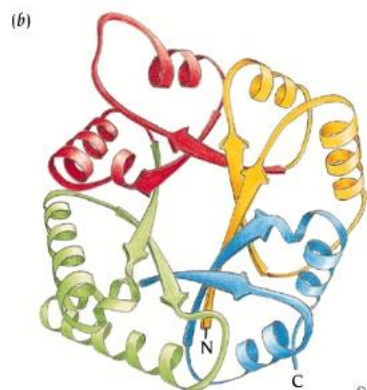
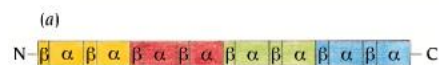
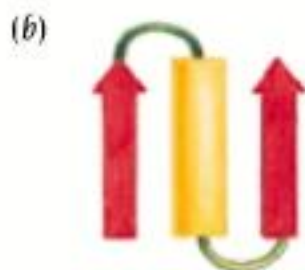
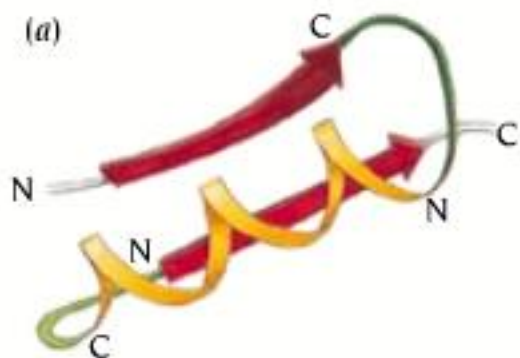
Ca^{+2} binding



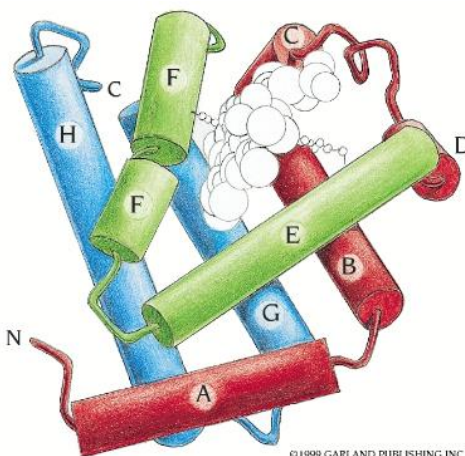
Δομικά μοτίβα

β - α - β

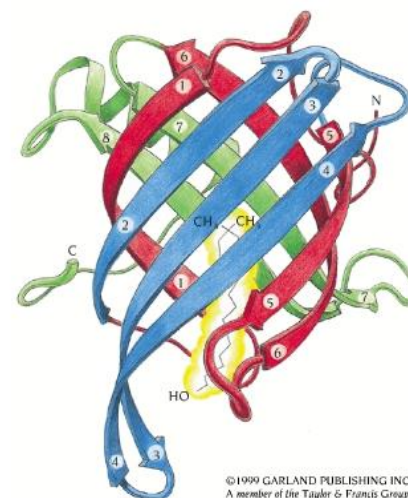
- 2 παράλληλα β -φύλλα που συνδέονται με μία α -έλικα



© 1999 GAR



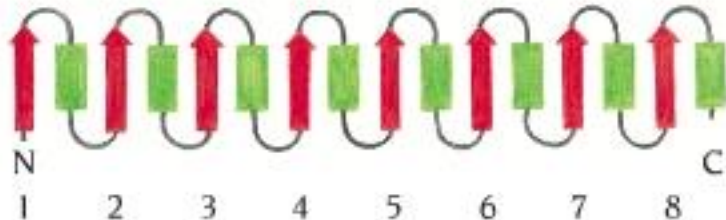
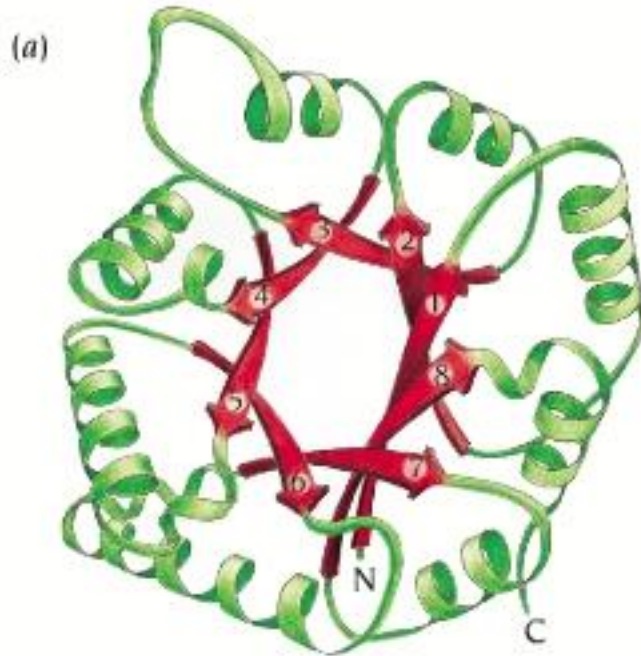
© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group



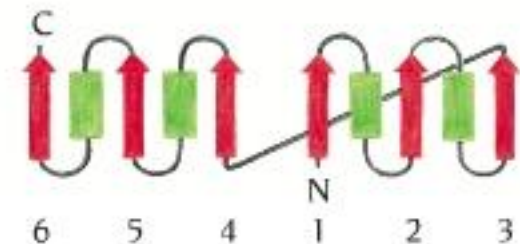
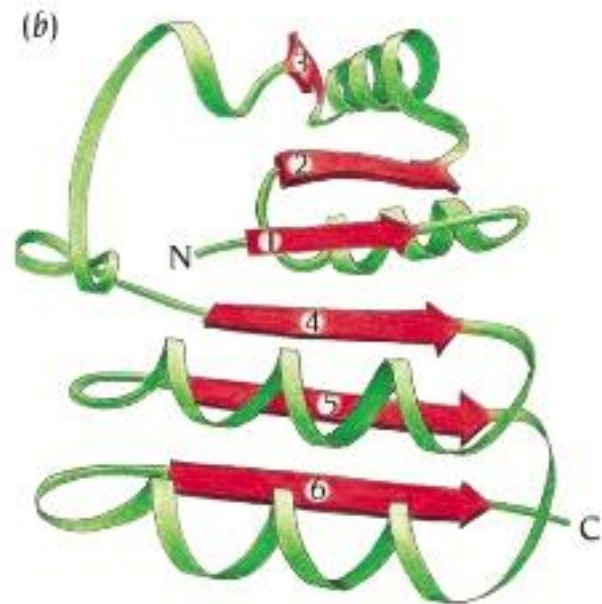
© 1999 GARLAND PUBLISHING INC.
A member of the Taylor & Francis Group

α/β δομές

TIM barrel

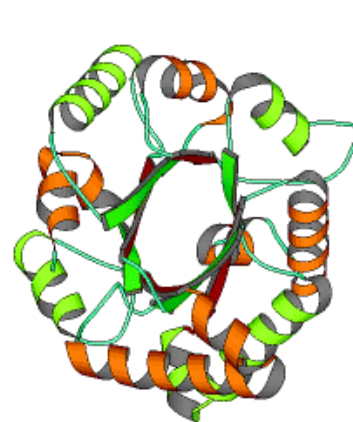


Rossman fold

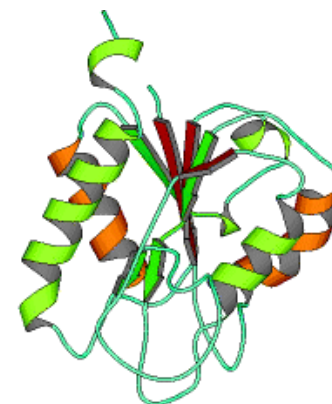


Δομή - λειτουργία

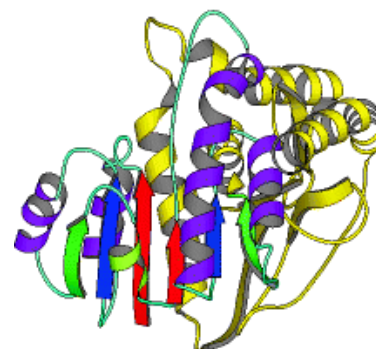
- ❖ Τοπικά μοτίβα βοηθούν στην τελική τρισδιάστατη δομή
- ❖ Κάθε κατηγορία ενζύμων συνήθως χαρακτηρίζεται από μία τυπική αναδίπλωση
- ❖ Τα μοτίβα μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για τους συμπαραγόντες που δεσμεύονται



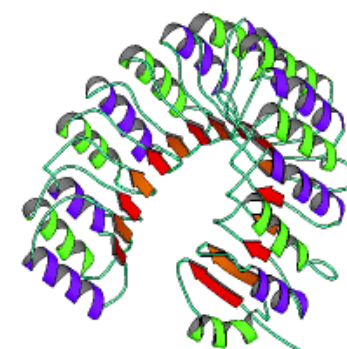
Triose Phosphate Isomerase
(1TIM, 247 residues, TIM barrel)



Flavodoxin (1AG9,
175 residues, open twisted)



Maltate Dehydrogenase
(2CMD, 312 residues)
Rossmann fold in
res. 1-145, rest - yellow

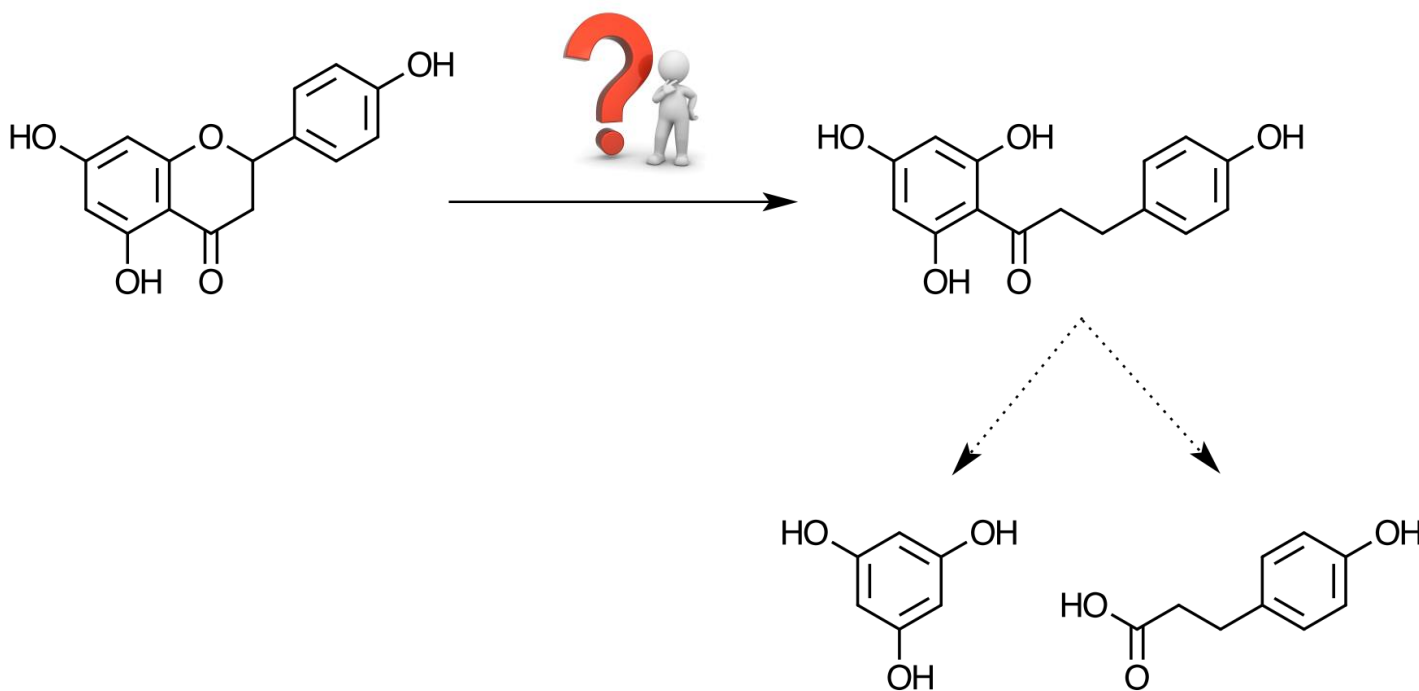


Ribonuclease Inhibitor
(1A4Y, 460 residues, horseshoe)

Παράδειγμα εύρεσης ενζύμου από μοτίβο

- ❖ Φλορετίνη: χρήση ως ενισχυτικό γλυκαντικής γεύσης
- ❖ Ο *Eubacterium ramulus* καταβολίζει φλαβονοειδή

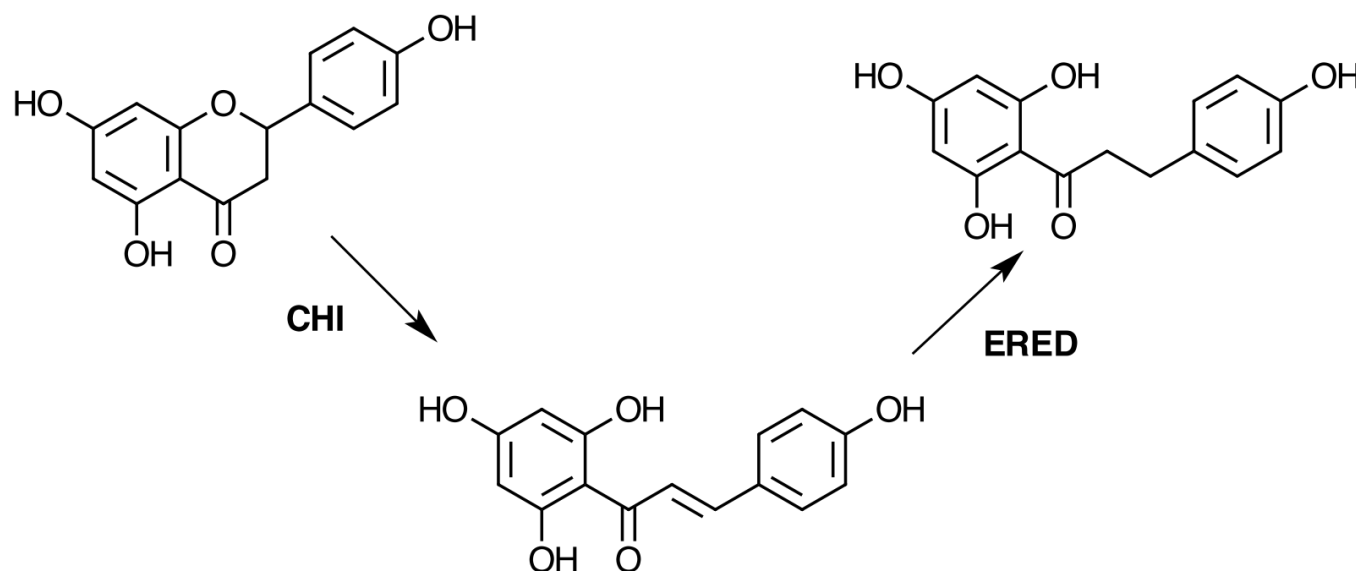
Schneider and Blaut (2000) Arch. Microb. **173**: 71-75



Παράδειγμα εύρεσης ενζύμου από μοτίβο

- ❖ Φλορετίνη: χρήση ως ενισχυτικό γλυκαντικής γεύσης
- ❖ Ο *Eubacterium ramulus* καταβολίζει φλαβονοειδή

Schneider and Blaut (2000) Arch. Microb. **173**: 71-75



Gall et al. (2014) Angew. Chem. Int. Ed. **53**: 1429-1442

Παράδειγμα εύρεσης ενζύμου από μοτίβο

KF154735	1	10	20	30	40	50	60	70
	MAKRNQYFFH	MSSEGLVSK	TEENRLEAEE	ALFAFEHYIE	LNPDPFGYTT	PEPRAAFRL	EAALGSAE	
P32382.1	MTHFEN	MSSEGLVSK	VEENRIVPE	MATN-----	---LANEDS	SMSRLILNYE	MAARSGVEM	
C36912	MDMKHSR	MSSEGLVSK	TEENRIVPE	MSM-----	---DYEAAS	TPPRLAIVE	MPASGSEY	
CAA71086.1	MKNKS	MSSEGLVSK	EVNIVSFAE	MGAF-----	---GLVDHSE	CYNRAVIE	MSSEGLVSK	
KF154735	100	110	120	130	140			
	VCSESSPNH	BYDRPFEP	YLDFTSRSE	QFEIMKSTN	MKSSGAFPM	GEM-SSCS-E	IKTNIGDGRN	
P32382.1	TEENRIVPE	POGNVACQ-	---LRNEDD	YAGFFFLAN	AMHSCAKIE	MTH-HAER	TTFEITEGHQ	
C36912	VEENRIVPE	NYEYMGNTI	---AIDRDE	LNPQFFBPM	RKREASTIV	PMH-HHFPB	SVCSTYRH-EA	
CAA71086.1	VEENRIVPE	BIDNVVPGVI	PI-IENHGR	FMSTSEMTS	RKREASTIV	PMH-HHFPB	GAFSTLTSQ	
KF154735	150	160	170	180	190	200	210	
	RGSESEKDL	DGSHDE--AF	AKPELSCY	DVITCKWFA	AAQWECNTH	CGH-SNTPA	ESSEQYVAT	
P32382.1	MAASPVPCS	FLGTQD-REI	AINRTEENR	QENDVVRN	GAMDEECIT	GAE-SNIG	ESSEQYVAT	
C36912	MAASPVPCS	-NCHDS-SH	SIDRTEENR	QENDVVRN	GAMDEECIT	GAE-SNIG	ESSEQYVAT	
CAA71086.1	MAASPVPCS	WDFTPCSE	SIDRTEENR	QENDVVRN	GAMDEECIT	GAE-SNIG	ESSEQYVAT	
KF154735	220	230	240	250	260	270	280	
	DEKSSFPNG	ARSTVDIANT	VEAMAPDV	TEPVS---	-S-----	-SEHPELE	TEADNYC	
P32382.1	DEKSSFPNG	MAPEPFR	TEAMAPDV	TEPVS---	-----	-SEHPELE	TEADNYC	
C36912	DEKSSFPNG	MAPEPFR	TEAMAPDV	TEPVS---	-----	-SEHPELE	TEADNYC	
CAA71086.1	DEKSSFPNG	MAPEPFR	TEAMAPDV	TEPVS---	-----	-SEHPELE	TEADNYC	
KF154735	290	300	310	320	330	340	350	
	CBPY-EDMTH	MSCHLSS	RSWEPTAYA	EPHPEPNA	VIKONNEN	AAQWECNTH	QAEABAS	
P32382.1	LEPCHHITH	MSAIES-	MPILLESPE	EQWRVLYE	ETANVNEV	ITNVRPPE	PMH-HHFPB	
C36912	LEPCHHITH	MSAIES-	MPILLESPE	EQWRVLYE	ETANVNEV	ITNVRPPE	PMH-HHFPB	
CAA71086.1	LEPCHHITH	MSAIES-	MPILLESPE	EQWRVLYE	ETANVNEV	ITNVRPPE	PMH-HHFPB	
KF154735	360	370	380	390	400	410	420	
	IDVMSGRQ	FADAEENR	KESHAENR	QGRGRCYFE	PSGEHETEN	TVKFPFLDS	TEENRIVPE	
P32382.1	ADPVAERH	FADAEENR	KESHAENR	QGRGRCYFE	PSGEHETEN	TVKFPFLDS	TEENRIVPE	
C36912	ADPVAERH	FADAEENR	KESHAENR	QGRGRCYFE	PSGEHETEN	TVKFPFLDS	TEENRIVPE	
CAA71086.1	ADPVAERH	FADAEENR	KESHAENR	QGRGRCYFE	PSGEHETEN	TVKFPFLDS	TEENRIVPE	
KF154735	430	440	450	460	470	480	490	
	SHHKVLPDR	KEPEASR	MASSCGE	TAMASDRGH	QWIFCKSGV	MSGLNFTDH	TDHVRVINE	
P32382.1	SEGVNSIEK	QAPV-KAAV	MASSCGE	TAMASDRGH	QWIFCKSGV	MSGLNFTDH	TDHVRVINE	
C36912	SEGVNSIEK	QAPV-KAAV	MASSCGE	TAMASDRGH	QWIFCKSGV	MSGLNFTDH	TDHVRVINE	
CAA71086.1	SEGVNSIEK	QAPV-KAAV	MASSCGE	TAMASDRGH	QWIFCKSGV	MSGLNFTDH	TDHVRVINE	
KF154735	500	510	520	530	540	550	560	
	KDLIRIDEN	RPEERLNE	VPEERLNE	EBAAVAVS	DDILEPESI	EN---AVVA	MDVSNDA-	
P32382.1	RDLIRIDEN	AGVPRSGVT	ADAPTAAAS	EDVVAACS	EPNTPRIGA	SKENTFPQA	MDVVAEKVSF	
C36912	RDLIRIDEN	AGVPRSGVT	ADAPTAAAS	EDVVAACS	EPNTPRIGA	SKENTFPQA	MDVVAEKVSF	
CAA71086.1	RDLIRIDEN	AGVPRSGVT	ADAPTAAAS	EDVVAACS	EPNTPRIGA	SKENTFPQA	MDVVAEKVSF	
KF154735	570	580	590	600	610	620	630	
	GLERSTHW	SCVCEBA	-----	---DYIDH	SVETIVEM	GAMPETTG	---YTAHD	
P32382.1	GLERSTHW	SCVCEBA	-----	---DYIDH	SVETIVEM	GAMPETTG	---YTAHD	
C36912	GLERSTHW	SCVCEBA	-----	---DYIDH	SVETIVEM	GAMPETTG	---YTAHD	
CAA71086.1	GLERSTHW	SCVCEBA	-----	---DYIDH	SVETIVEM	GAMPETTG	---YTAHD	
KF154735	640	650	660	670	680	690	700	
	FEENRSGYE	VNAKVM-G	KDFVIAEDS	REITKNSD	VANMERHA	TEADTAEN	AGIEPWRK	
P32382.1	FEENRSGYE	VNAKVM-G	KDFVIAEDS	REITKNSD	VANMERHA	TEADTAEN	AGIEPWRK	
C36912	FEENRSGYE	VNAKVM-G	KDFVIAEDS	REITKNSD	VANMERHA	TEADTAEN	AGIEPWRK	
CAA71086.1	FEENRSGYE	VNAKVM-G	KDFVIAEDS	REITKNSD	VANMERHA	TEADTAEN	AGIEPWRK	
KF154735	710	720	730	740	750	760	770	
	CVARVIGHA	VRPSTANME	FE					
P32382.1	CVARVIGHA	VRPSTANME	FE					
C36912	CVARVIGHA	VRPSTANME	FE					
CAA71086.1	CVARVIGHA	VRPSTANME	FE					

Δεν είχαμε πρότερη γνώση για την ERED
Στοίχιση 34 γνωστών ERED για εύρεση μοτίβου



Διαλογή ORF μέσω των μοτίβων
Μόνο 1 επιτυχία



Πρωτεΐνη 75 kDa
Θέσεις πρόσδεσης NADH, FMN & συστοιχίας Fe_4S_4
< 30% ταυτότητα με τις γνωστές EREDs
Πρώτη βακτηριακή ERED

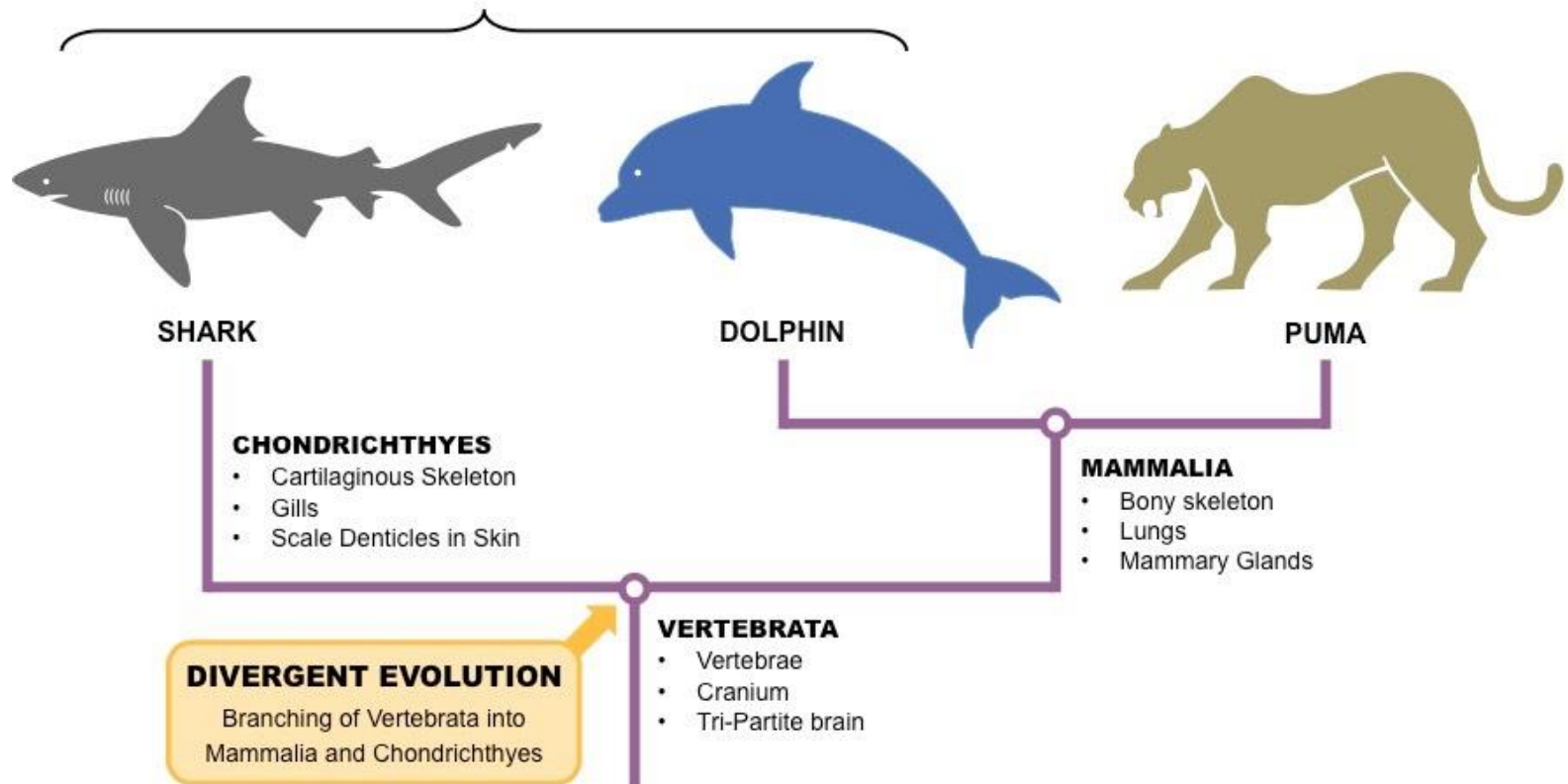
Gall et al. (2014) Angew. Chem. Int. Ed. 53: 1429-1442

Εξέλιξη

Συγκλίνουσα εξέλιξη

CONVERGENT EVOLUTION

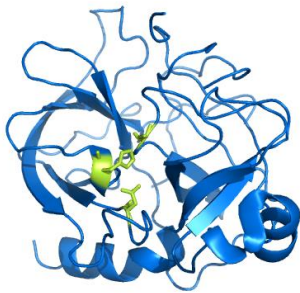
Streamlined Shape due to Aquatic Environment (Shared Selection Pressure)



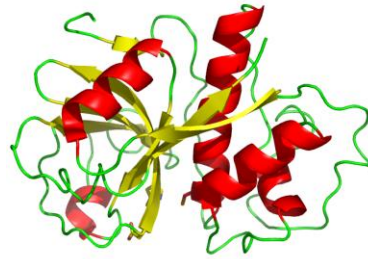
Αποκλίνουσα εξέλιξη

Εξέλιξη πρωτεϊνών

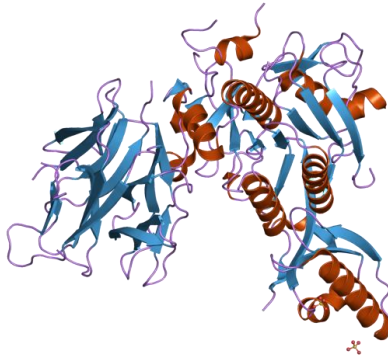
Συγκλίνουσα εξέλιξη



Χυμοθρυψίνη



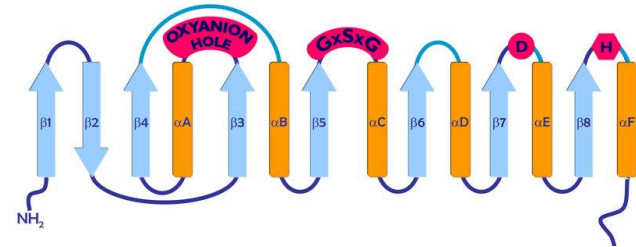
Παπαΐνη



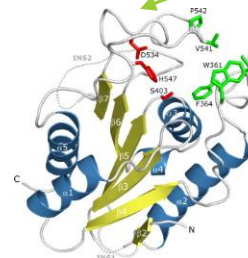
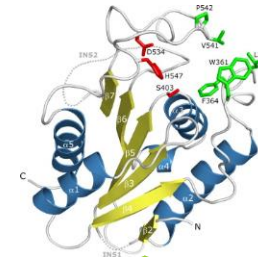
Σαμπτυλυσίνη

Todd et al. (2002) Trends Biochem. Sci. 27: 419-426

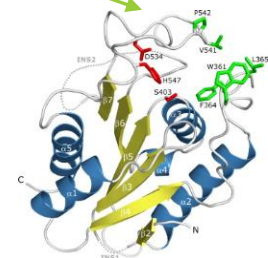
Αποκλίνουσα εξέλιξη



Μοτίβο α/β
υδρολάσης



Λιπάσες



Πρωτεάσες

Gerlt & Babbitt (1998) Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 607-612

Κατηγοριοποίηση ενζύμων

Ονοματολογία ενζύμων

Ο Duclaux το 1883 ονομάτιζε τα ένζυμα σύμφωνα με το υπόστρωμα τους.

-άση: αμυλάση, αμινοτρανσφεράση, πολυμεράση

- ❖ Όνομα σύμφωνα με το υπόστρωμα (π.χ. αμυλάση)
- ❖ Όνομα σύμφωνα με την αντίδραση (π.χ. αναγωγάση)
- ❖ Όνομα σύμφωνα με το υπόστρωμα και την αντίδραση (αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος)
- ❖ Όνομα σύμφωνα με το προϊόν που παράγεται (φουμαράση)



Émile Duclaux

Σε αρκετά πρωτεολυτικά ένζυμα χρησιμοποιείται η κατάληξη **-ίνη** (θρυψίνη, σαμπτιλυσίνη, θρομβίνη κ.ά.)

Κατάταξη ενζύμων

Ονοματολογία κατά τη Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission)

EC	Όνομα	Φύση αντίδρασης
1	Οξειδοαναγωγάσες	Μεταφορά ατόμων υδρογόνου ή οξυγόνου, ή ηλεκτρονίων μεταξύ μορίων
2	Μεταφοράσες	Μεταφορικά λειτουργικών ομάδων μεταξύ μορίων
3	Υδρολάσες	Διάσπαση δεσμών με την συμμετοχή νερού
4	Λυάσες	Απόσπαση ομάδων (χωρίς την συμμετοχή νερού)
5	Ισομεράσες	Ενδομοριακές αναδιατάξεις
6	Λιγάσες/Συνθετάσες	Συνένωση δύο μορίων (ταυτόχρονη κατανάλωση ATP)
7	Τρανσλοκάσες	Μεταφορά ιόντων ή μορίων μεταξύ μέσω των μεμβρανών

Κωδικός ενζύμου (Enzyme Code - EC XX.XX.XX.XX)

Αριθμητική κατηγοριοποίηση με τέσσερα ψηφία

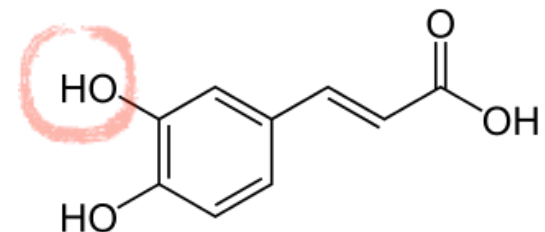
Παράδειγμα:

EC 2. Μεταφοράση

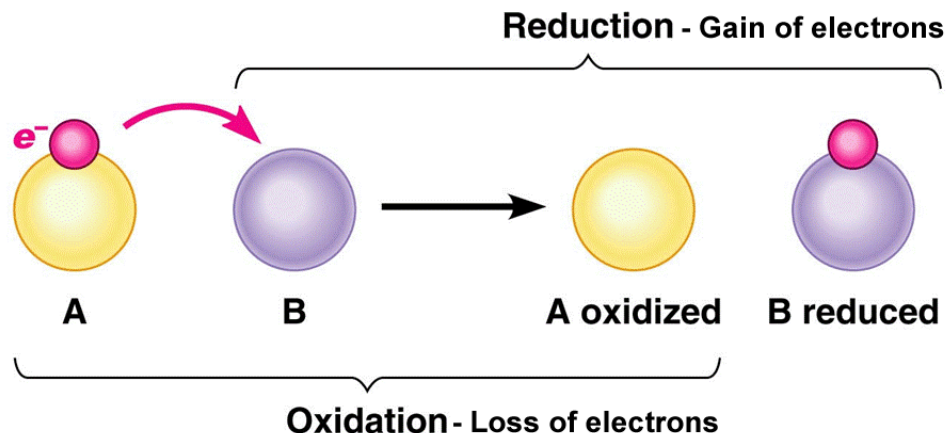
EC 2.1. Μεταφορά μίας ομάδας με έναν άνθρακα

EC 2.1.1. Μεθυλομεταφοράση

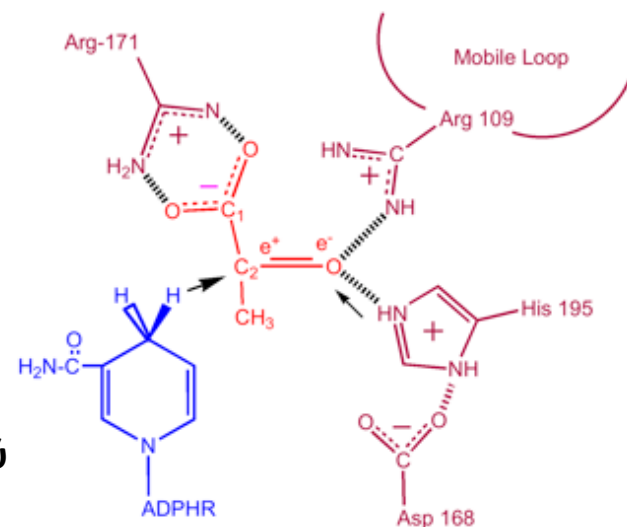
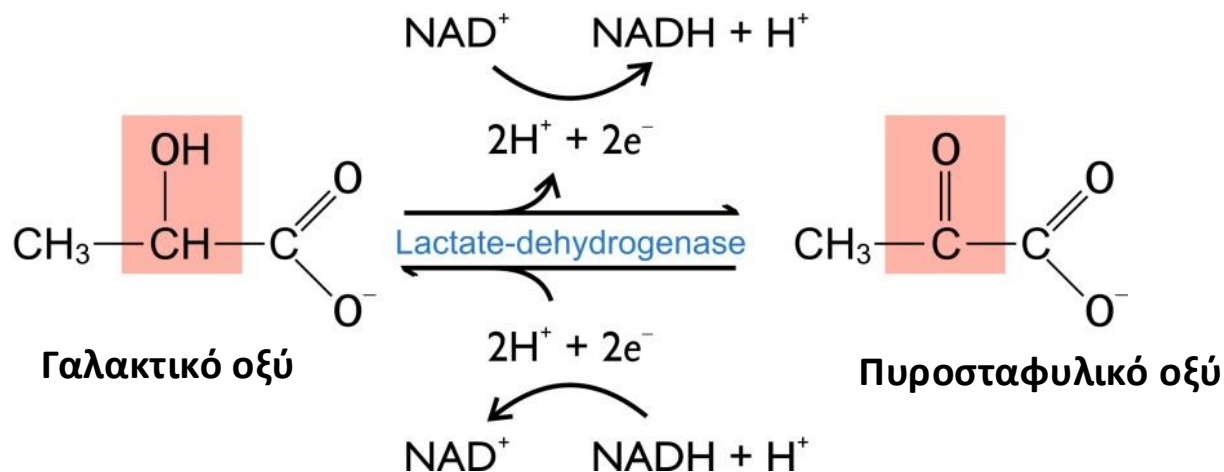
EC 2.1.1.68 Ο-μεθυλομεταφοράση του καφεϊκού οξέος



EC1: Οξειδοαναγωγές



Γαλακτική αφυδρογονάση
(EC 1.1.1.27, S-γαλακτικό: NAD⁺ οξειδοαναγωγήση)

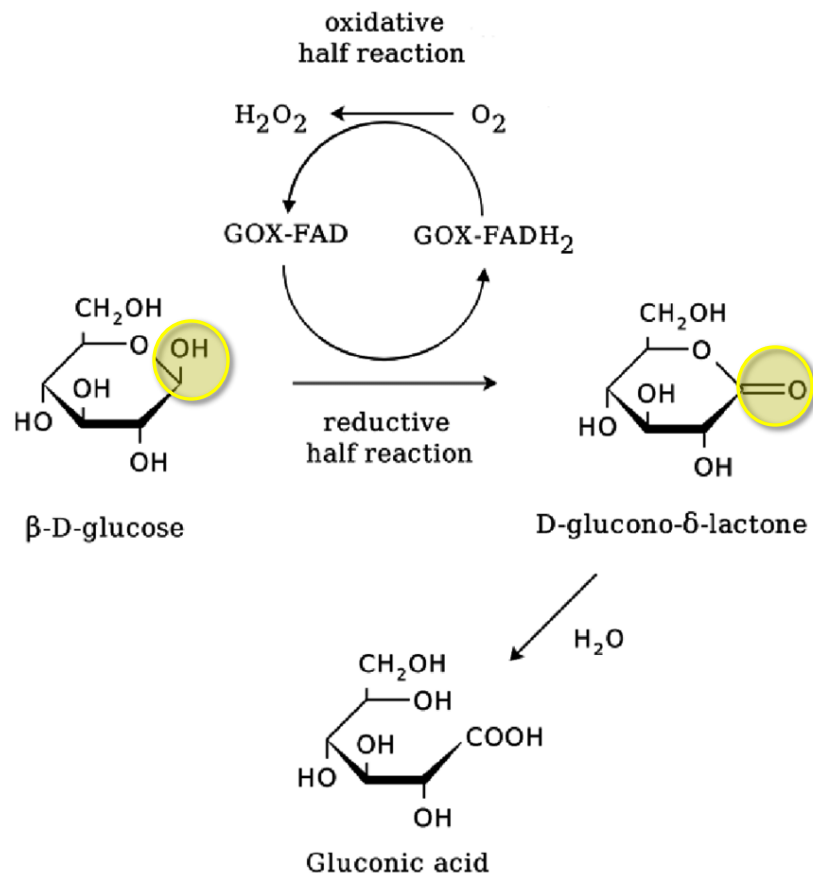
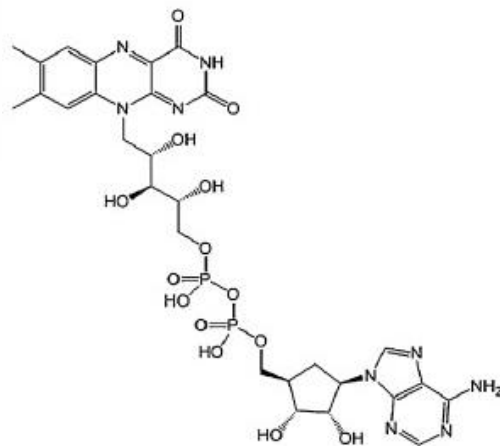
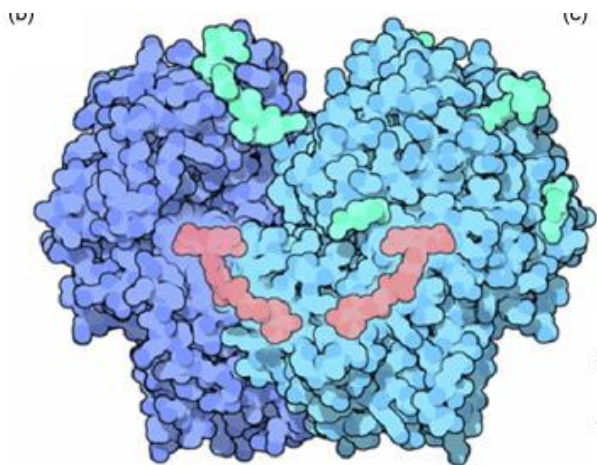


EC1: Οξειδοαναγωγές

Οξείδωση γλυκόζης

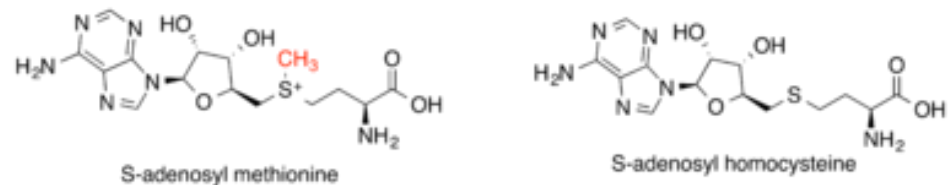
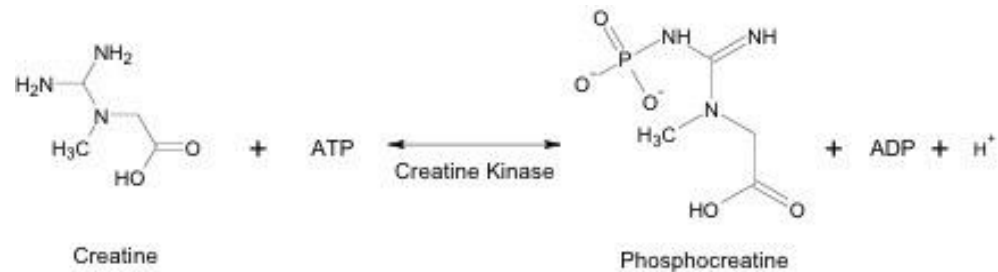
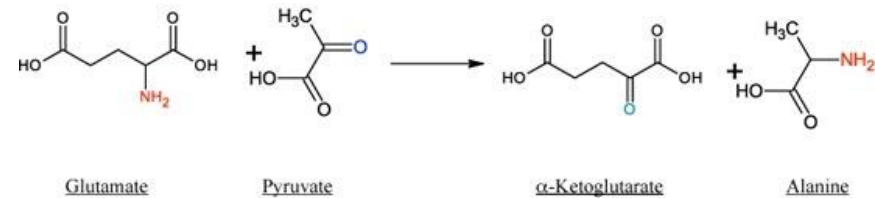
(EC 1.1.3.4., β -D-γλυκόζη: οξυγόνο 1-αναγωγή)

Φλαβινονουκλεοτίδιο ως συνένζυμο



EC2: Τρανσφεράσες

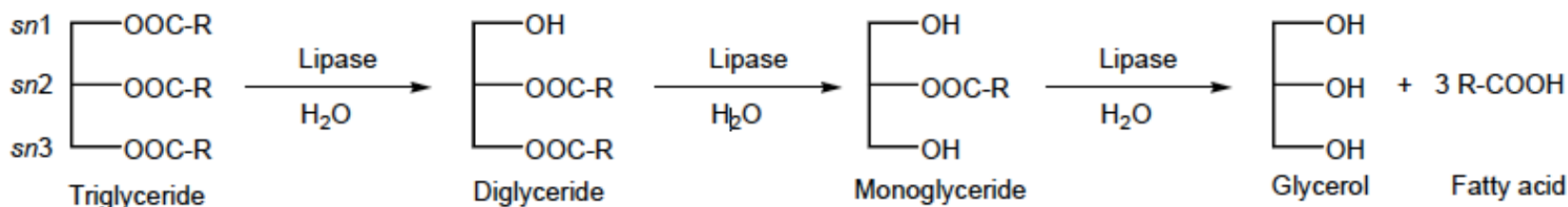
- Αμινοτρανσφεράσες:
Μεταφορά αμινομάδων (PLP)
- Κινάσες:
Μεταφορά φωσφορικών ομάδων
(ADP/ATP)
- Μεθυλοτρανσφεράσες:
Μεταφορά μεθυλο-ομάδας (SAM)



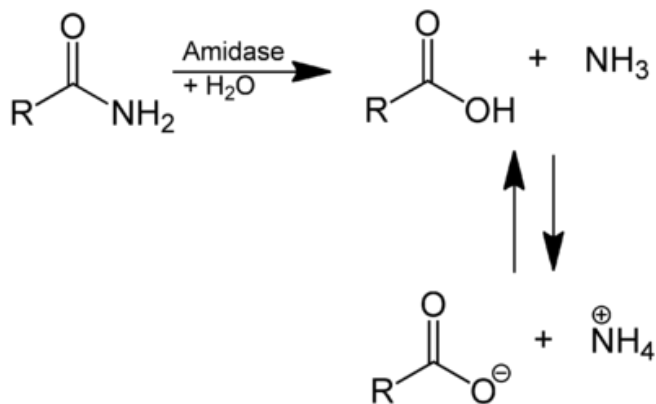
EC3: Υδρολάσες

Λιπάσες / Εστεράσες

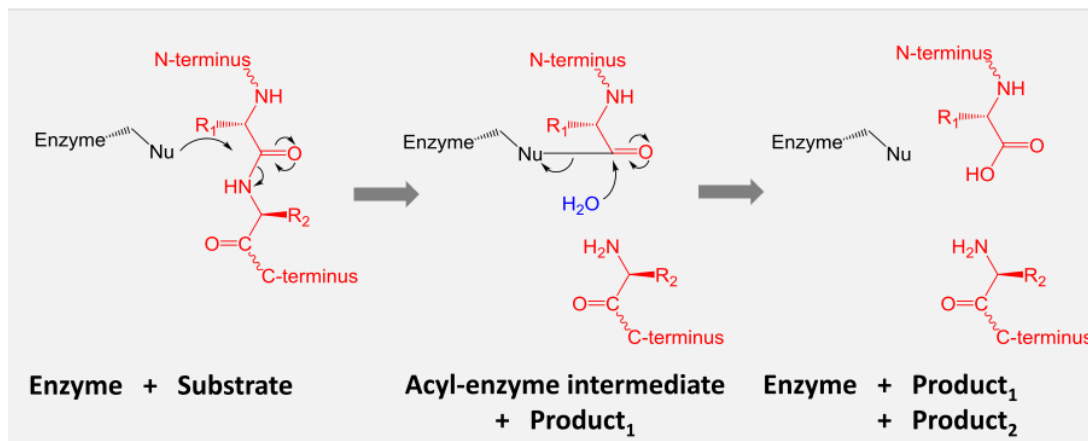
Κατηγοριοποίηση από το μήκος του υποστρώματος



Αμιδάσες

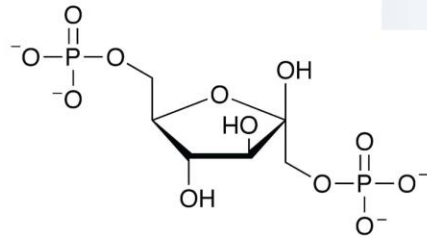


Πεπτιδάσες

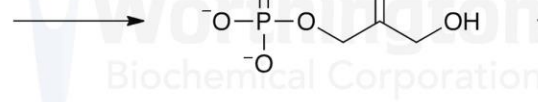


EC4: Λυάσεις

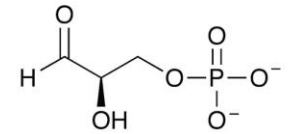
Αλδολάσες



D-Fructose-1,6-diphosphate

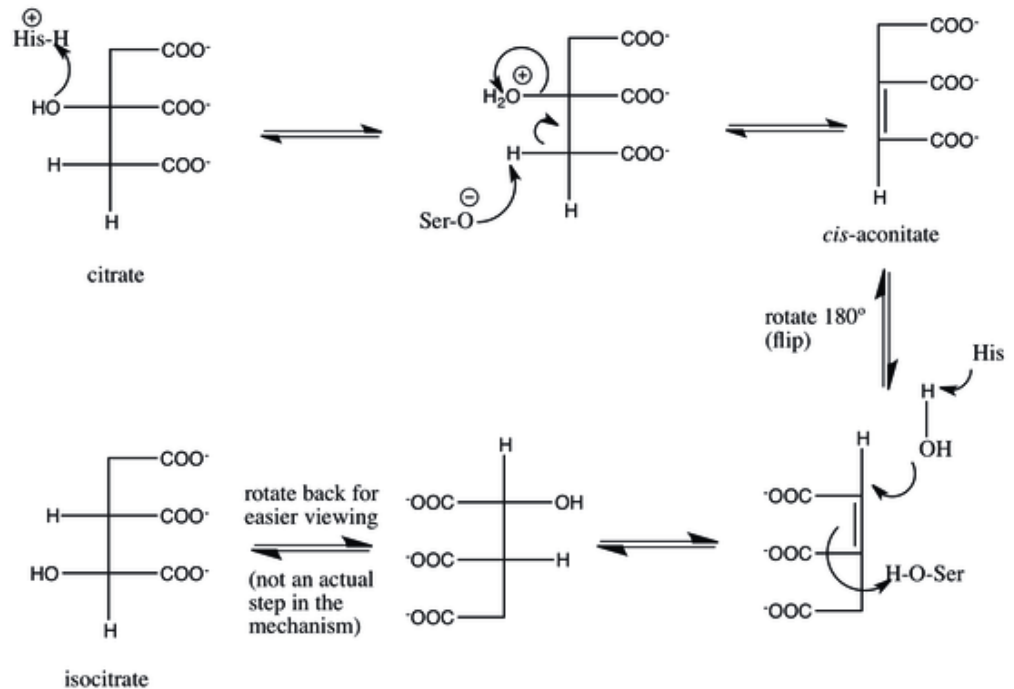


Dihydroxyacetone phosphate



D-Glyceraldehyde-3-phosphate

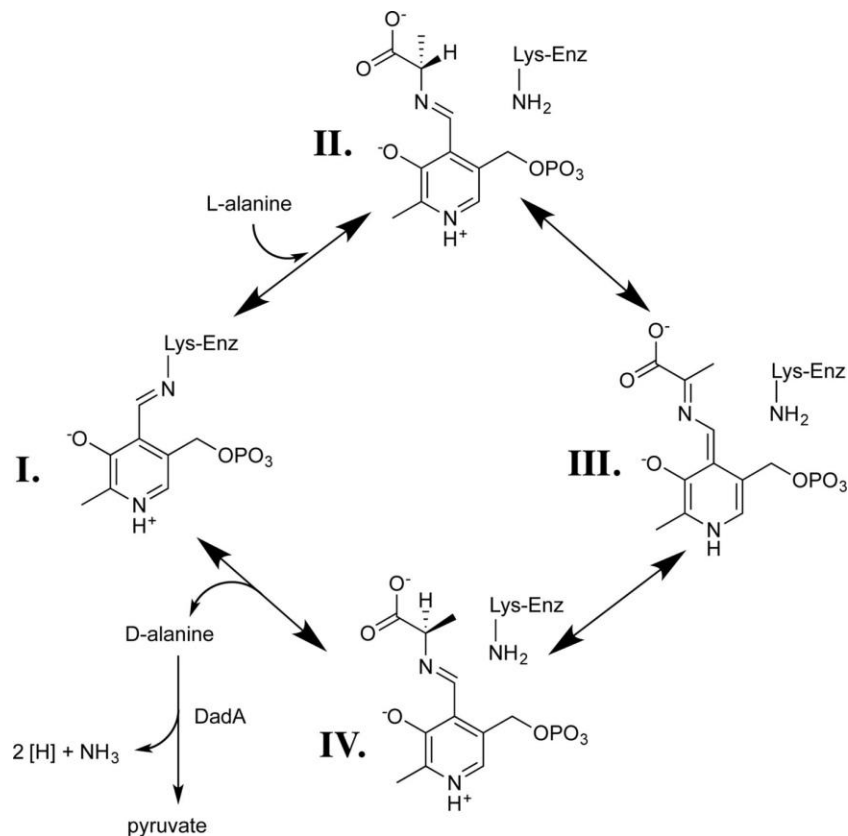
Aconitate hydroatease



EC5: Ισομεράσεις

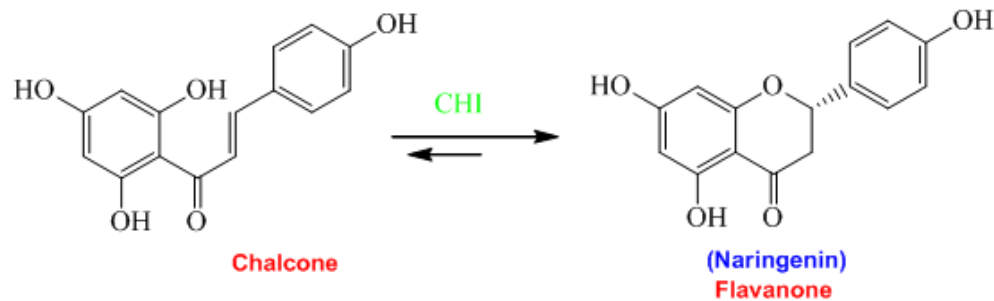
Ρακεμάση αλανίνης

(EC 5.1.1.1, PLP)



Ισομεράση χαλκόνης

(EC 5.5.1.6, NADH)

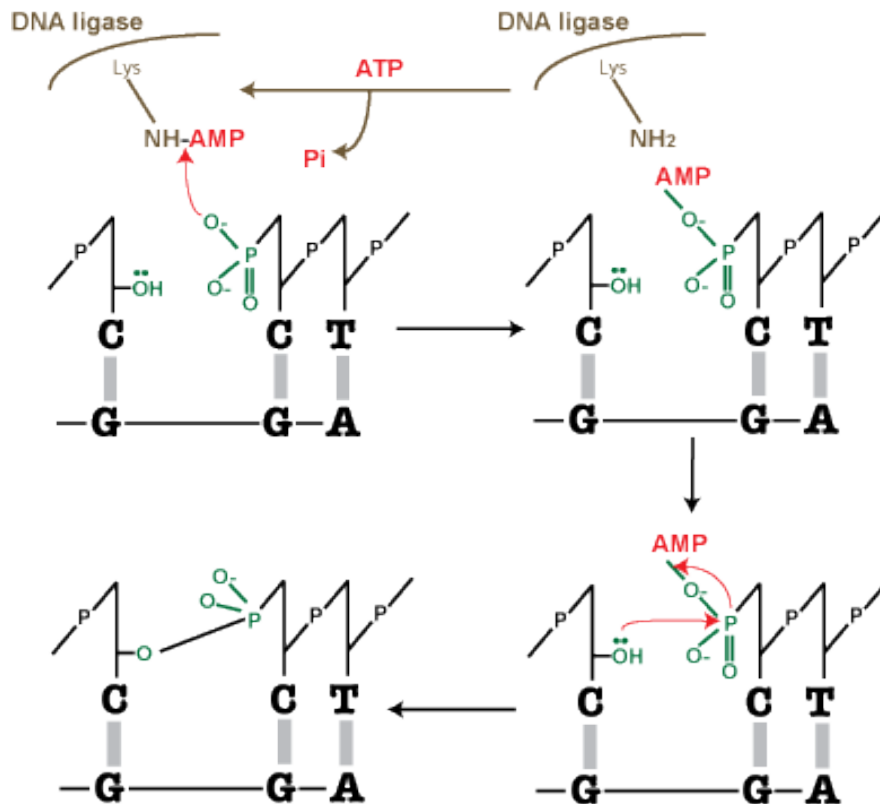


CHI: Chalcone isomerase

EC6: Συνθετάσες

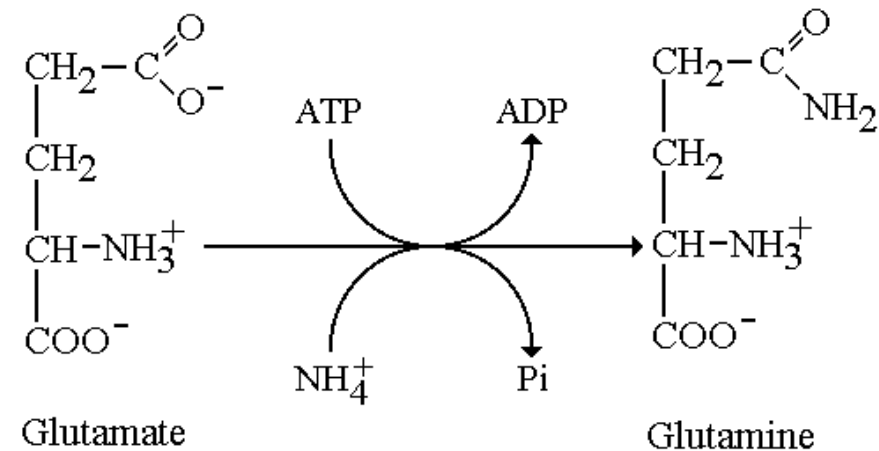
Λιγάση DNA

(EC 6.5.1.1, ATP)



Συνθετάση γλουταμίνης

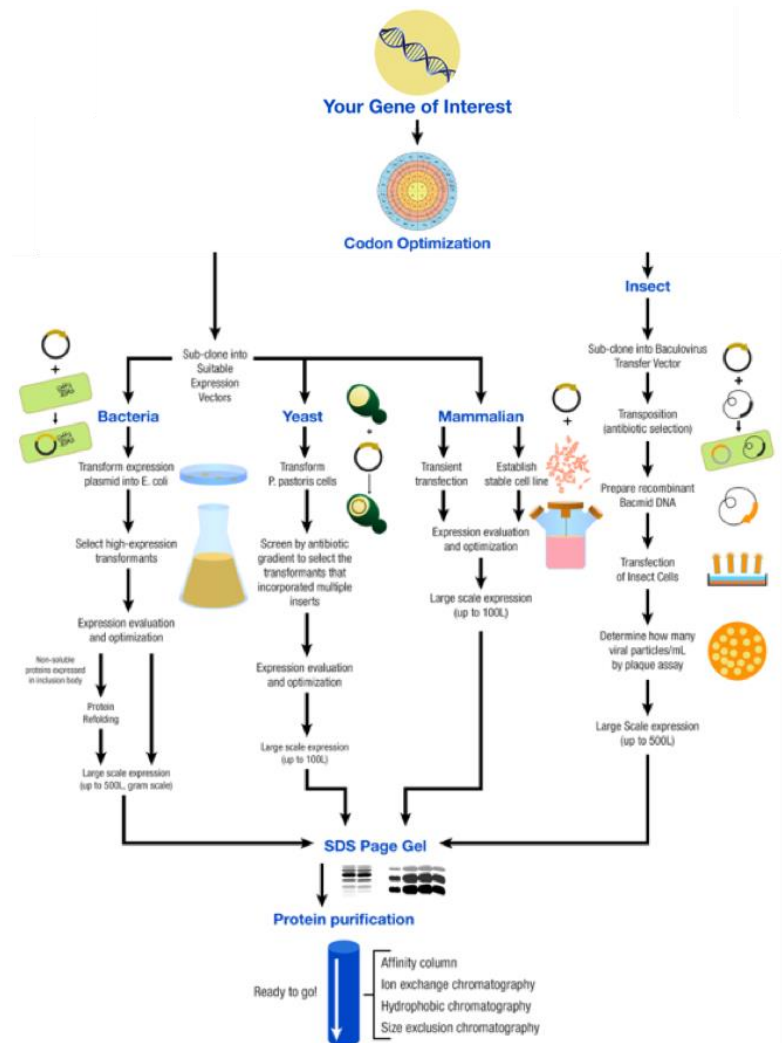
(EC 6.3.1.2, ATP)



Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

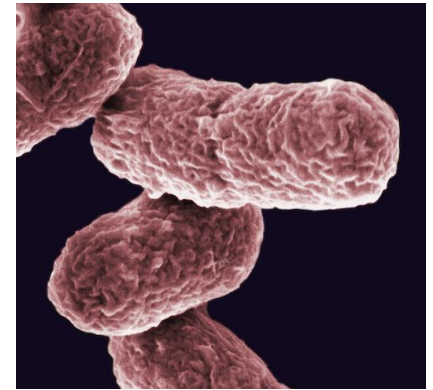
- ❖ Μεταφορά γενετικού υλικού από ένα οργανισμό σε έναν άλλο με σκοπό την έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται με χρήση της μεταγραφικής και μεταφραστικής «μηχανής» του κυττάρου ξενιστή.



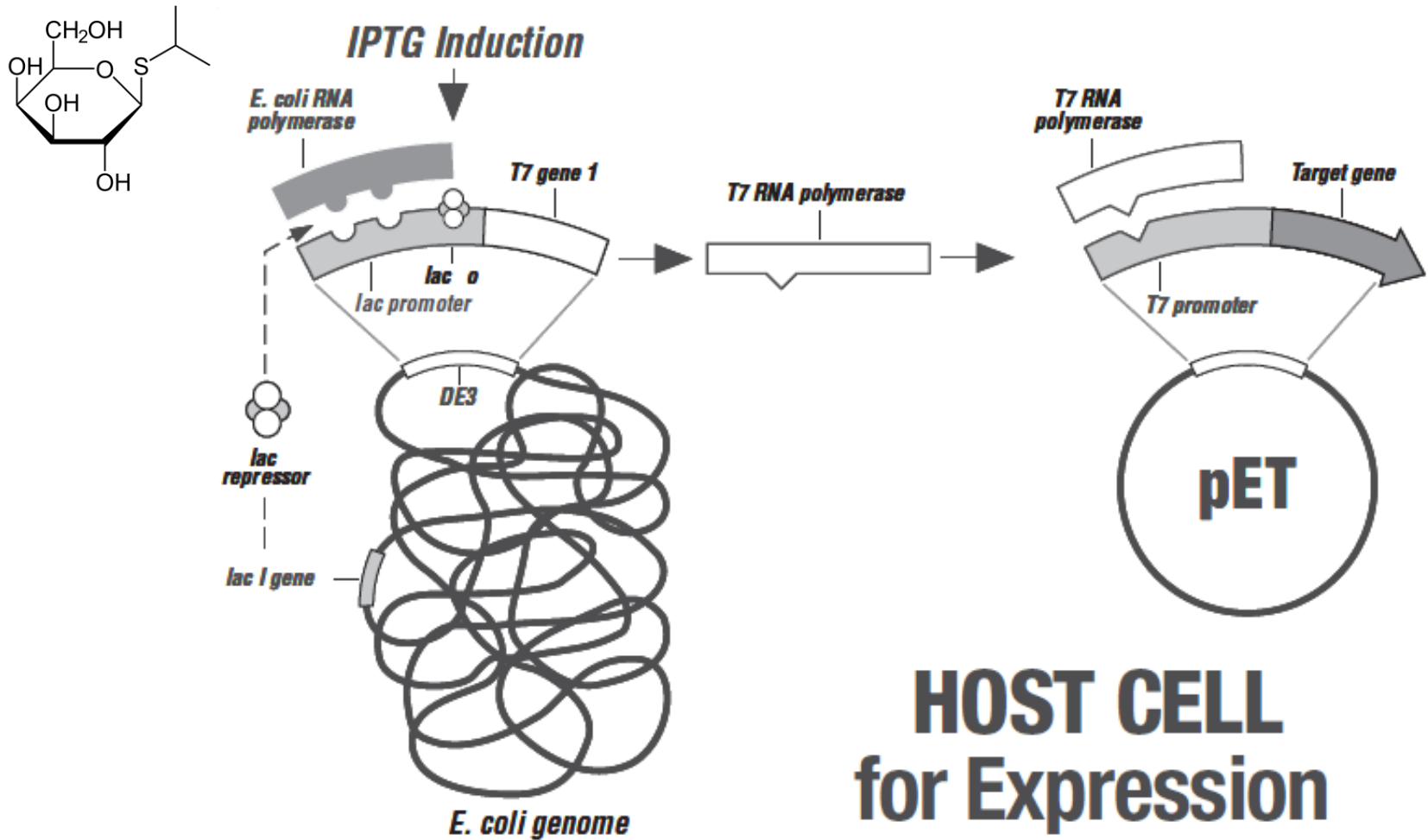
Έκφραση σε βακτήρια

Escherichia coli - Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος οργανισμός ξενιστής

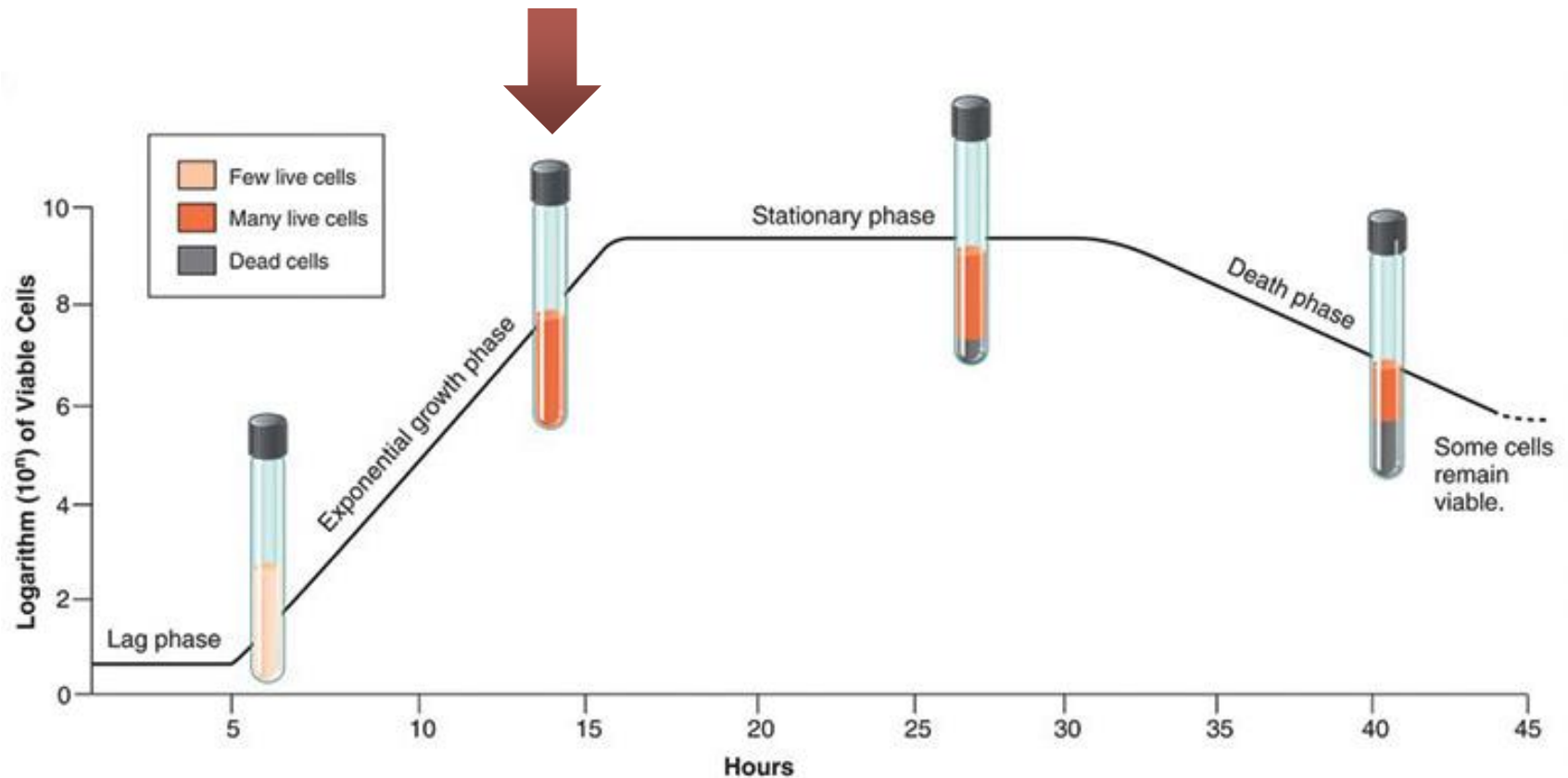
- ❖ Gram αρνητικά βακτήρια
- ❖ Γονιδίωμα 4.6 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων (πλήρης αλληλούχηση το 1997)
- ❖ Προαιρετικά αναερόβιος - χημειοτερότροφος
- ❖ Χρόνος διαίρεσης: 20-30 min σε βέλτιστες συνθήκες (37°C)
- ❖ Ευκολία χειρισμού στο εργαστήριο (θερμοκρασία, μέσο ανάπτυξης)
- ❖ Χρήση πλασμιδίων για μεταφορά γενετικού υλικού
- ❖ Δύο κύρια εργαστηριακά στελέχη: K-12 and B



Ρύθμιση της έκφρασης

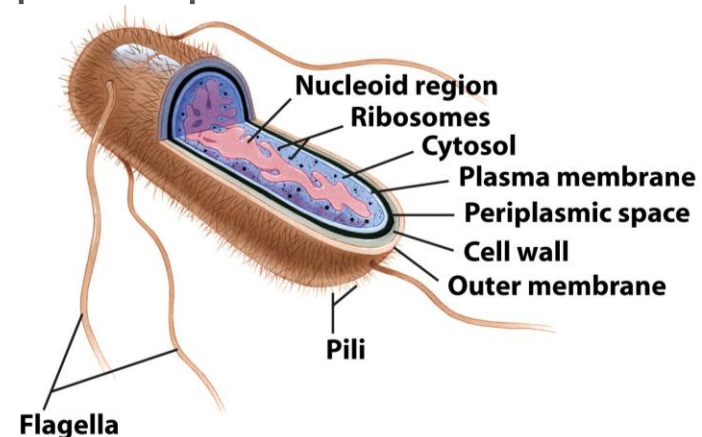
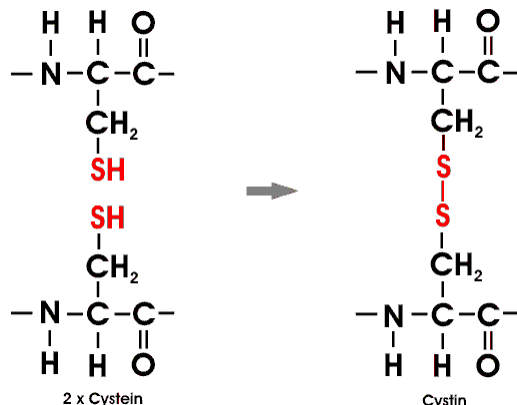


Ρύθμιση της έκφρασης

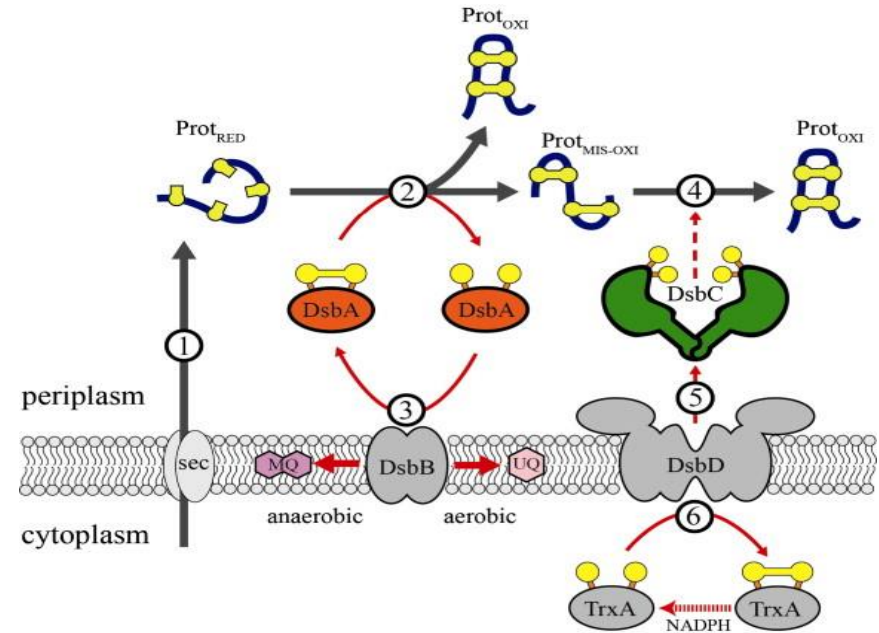
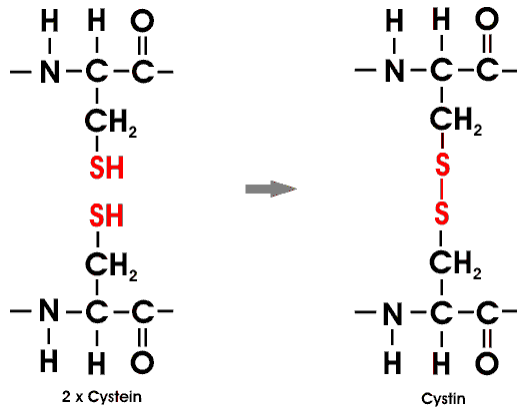


Δισουλφιδικοί δεσμοί στα *E. coli*

- ❖ Οξείδωση δύο κυστεϊνών
- ❖ Ευκαρυώτικα κύτταρα: Οξειδωτικό περιβάλλον στο κύτταρο
- ❖ *E. coli*: Αναγωγικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα
- ❖ Συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα (“*inclusion bodies*”)
- ❖ Πρωτόκολλα επαναδιάταξης μετά τον καθαρισμό
- ❖ Μεταφορά στο περίπλασμα
- ❖ Έκφραση Dsb-πρωτεϊνών στο περίπλασμα



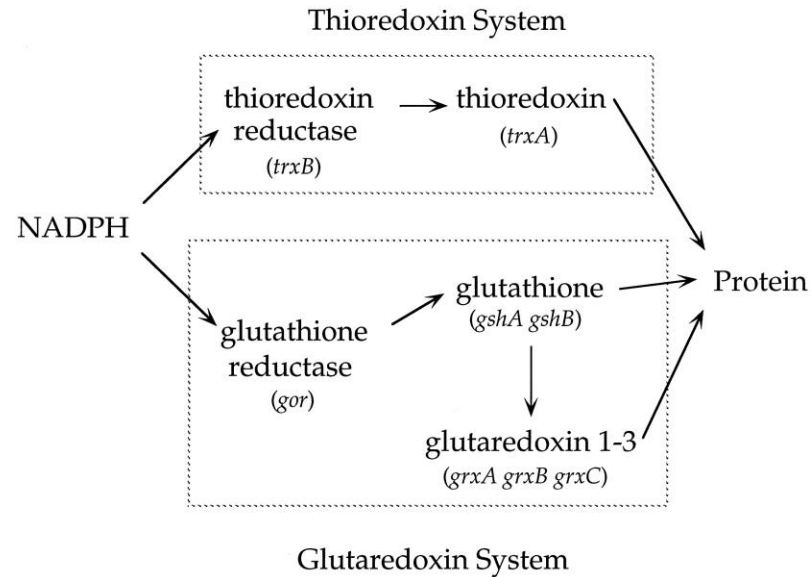
Έκφραση στο περίπλασμα



Πλεονέκτημα	Μειονέκτημα
Μειωμένη πρωτεόλυση	Συσσώρευση πρώιμων πρωτεϊνών
Μείωση των συσσωματωμάτων	Μεταφορά
Οξειδωτικό περιβάλλον	Χαμηλό επίπεδο έκφρασης
Σωστή αναδίπλωση δισουλφιδικών δεσμών	

Αλλαγή περιβάλλοντος

- ❖ Αναγωγικές συνθήκες στο κυτταρόπλασμα
- ❖ Μετάλλαξη κυτταροπλασματικών αναγωγασών
- ❖ Αναγωγή θειορεδοξίνης (trxB)
- ❖ Αναγωγή γλουταθειονίνης (gor)
- ❖ Η AhpC βοηθά στη βιωσιμότητα του στελέχους

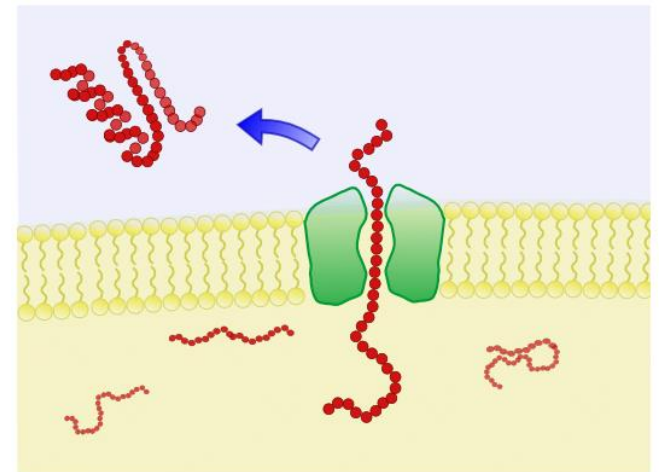


Στέλεχος	Μεταλλάξεις
Origami	trxB/gor/ahpC*
Rosetta-gami	trxB/gor/ahpC*
AD494	trxB
BL21trxB	trxB

Έκφραση πρωτεϊνών με δισουλφιδικούς δεσμούς στο κυτταρόπλασμα του στελέχους Shuffle
<https://international.neb.com/tools-and-resources/video-library/disulfide-bond-formation-in-the-cytoplasm-of-shuffle-cells>

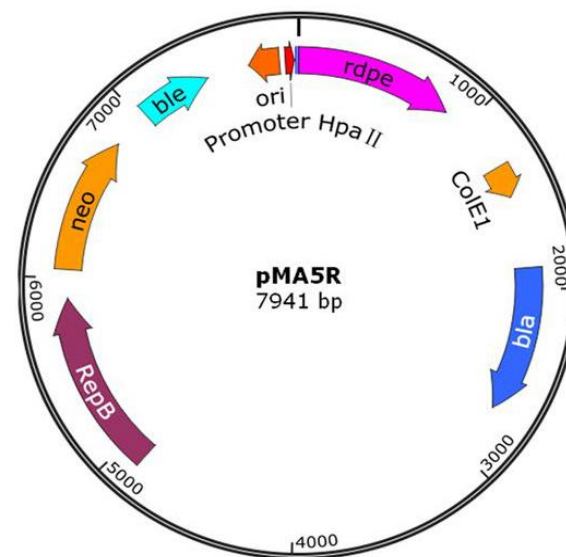
Bacillus subtilis

- ❖ Gram θετικό αερόβιο βακτήριο
- ❖ Προαιρετικά αερόβιο σε συγκεκριμένα μέσα
- ❖ Οργανισμός απομονωμένος από το έδαφος
- ❖ Καλή κατανόηση του οργανισμού
- ❖ Παραγωγή ενδοσπορίων
- ❖ Έκκριση πρωτεϊνών στο μέσο
- ❖ Χρόνος διπλασιασμού: 26 min @ 40°C



Bacillus subtilis

- ❖ Μονοπάτι έκκρισης Sec
- ❖ Μονοπάτι έκκρισης Tat
- ❖ Χρήση ABC μεταφορέων
- ❖ Σύστημα SUMO (έκφραση γονιδίων ρυθμισμένη από τη σαμππιλυσίνη)
- ❖ Έκφραση με χρήση
 - ❖ IPTG
 - ❖ Ξυλόζη
 - ❖ Μαλτόζη



Πλεονεκτήματα / Μειονεκτήματα

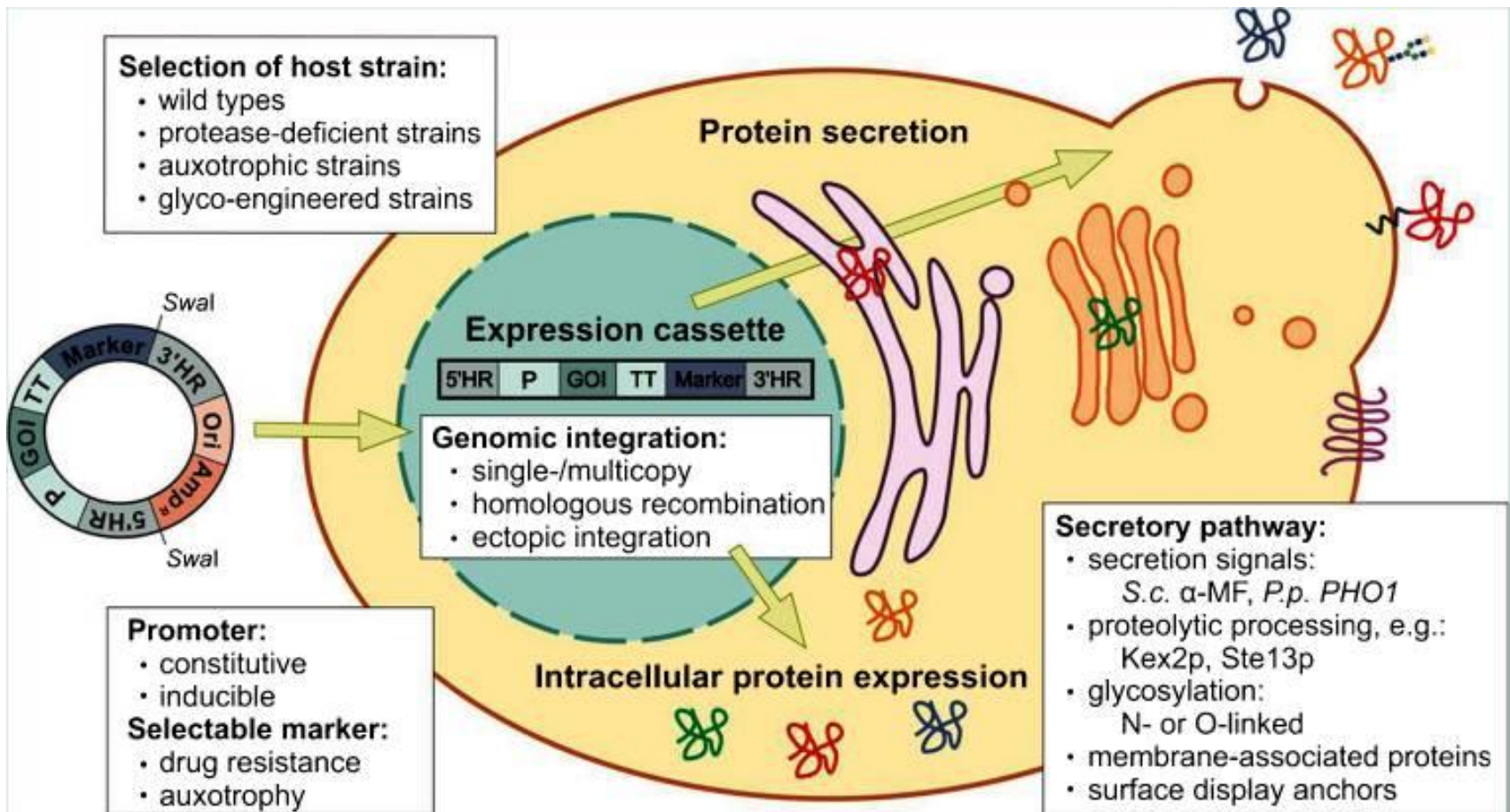
Πλεονέκτημα	Μειονέκτημα
GRAS	Συσσώρευση πρώιμων πρωτεϊνών
Πολύ σπάνια παθογόνο	Μεταφορά
Έκκριση των πρωτεϊνών (μονή μεμβράνη)	Χαμηλό επίπεδο έκφρασης
Σταθερότητα των ενδοσπορίων	Εξωκυττάρια πρωτεάσες
Φυσική δεκτικότητα	Περίπλοκος κύκλος (ενδοσπόρια)
Υψηλή παραγωγικότητα (20-25 g στο λίτρο)	

Pichia pastoris

- ❖ Ευκαρυωτικός οργανισμός (Ασκομύκητας)
- ❖ Μεθυλοτροφικός
- ❖ Γνωστό ως “*The E. coli of eucaryotes*”
- ❖ Οι οξειδάσες αλκοόλης ρυθμίζονται αυστηρά από υποκινητές ΑΟΧ και μπορούν να εκφραστούν σε έως και 30% του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών
- ❖ Χρόνος διπλασιασμού 2-4 ώρες σε βέλτιστες συνθήκες
- ❖ Πλέον αναφέρεται ως *Komagataella phaffii* (αν και έχει καθιερωθεί το παλίο όνομα)



Pichia pastoris



Πλεονεκτήματα

- ❖ Εύκολη γενετική τροποποίηση - σταθερά χωρίς αντιβιοτικά
- ❖ Φθηνά μέσα καλλιέργειας
- ❖ Σχετικά σύντομος χρόνος διπλασιασμού
- ❖ Πολύ υψηλές πυκνότητες κυττάρων σε καλλιέργειες ($< 600 \text{ g/L}$)
- ❖ ΑΟΧ υποκινητές
- ❖ Έκκριση στο μέσο
- ❖ Ευκαρυωτικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις

Σύγκριση

Escherichia coli



- Expresses >80 % of commercial microbial products
- Expresses simple to moderately complex proteins including Fabs
- Soluble expression simplifies recovery and downstream processing
- Produces aglycosylated proteins
- Ideal for plasmid DNA production

Pichia pastoris



- Expresses larger complex proteins and small polypeptides
- Solubility issues in *E. coli* may be solved with *Pichia*
- Secretes for easier recovery & downstream processing
- Lacks endotoxin

Bacillus subtilis



- Expresses simple monomeric proteins
- Soluble expression simplifies recovery and downstream processing
- Lacks endotoxin
- Produces aglycosylated protein

Ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

Δυνατή η παραγωγή ευκαρυωτικών πρωτεϊνών και δύσκολων συμπλόκων

- ❖ Διαλυτές πρωτεΐνες και σωστά αναδιπλωμένες
- ❖ Σωστές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις
- ❖ Έκφραση ανθρώπινων πρωτεϊνών, ως είναι

Παραγωγή π.χ. θεραπευτικών πρωτεϊνών

HEK 293

Human Embryonic Kidney

- ❖ Η πλέον χρησιμοποιούμενη σειρά κυττάρων από άνθρωπο για έκφραση πρωτεϊνών
- ❖ Χρήση για την ανάπτυξη εμβολίων, θεραπευτικών πρωτεϊνών, και βέκτορες αδενοϊών.
- ❖ Η σειρά των κυττάρων έγινε αθάνατη μέσω της διαμόλυνσης με το DNA του αδενοϊού 5 (1973)

Πλεονεκτήματα:

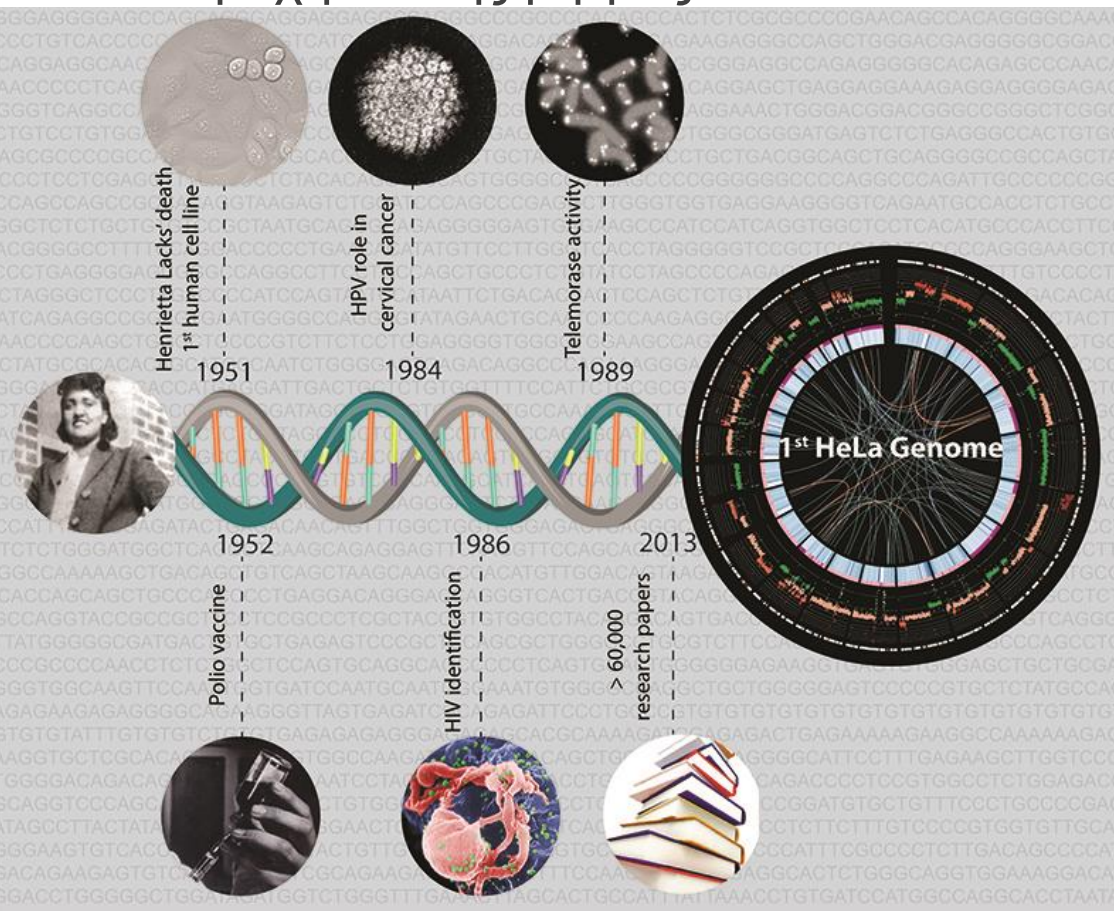
- ❖ Εύκολη καλλιέργεια
- ❖ Εύκολη διαμόλυνση
- ❖ Έκκριση πρωτεϊνών στο μέσο
- ❖ *In vivo* ανάλυση

Μειονεκτήματα:

- ❖ Ακριβό μέσο καλλιέργειας
- ❖ Μεγάλος χρόνος διπλασιασμού (24h)
- ❖ Εύκολη επιμόλυνση

Henrietta Lacks cells

Henrietta Lacks (1920-1951), πέθανε 31 χρονών από καρκίνο τραχήλου της μήτρας

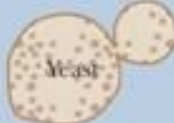
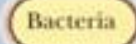
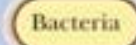
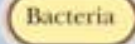


- ❖ Πρώτη “αθάνατη σειρά” κυττάρων ανθρώπου
- ❖ Εύκολη καλλιέργεια
- ❖ Αυξάνονται γρηγορότερα από κανονικά κύτταρα
- ❖ Φυσιολογικός μεταβολισμός
- ❖ Μπορούν να τροποποιηθούν να προσομοιώνουν κάποιους ιστούς

E.coli vs. HEK293

	<i>E. coli</i>	HEK293T
Χρόνος γενεάς	30 min	~ 20 h
Παραγωγικότητα	Υψηλές συγκεντρώσεις	Χαμηλές συγκεντρώσεις
Κόστος καλλιέργειας	Χαμηλό	Υψηλό
Μέσο καλλιέργειας	Εύκολη βελτιστοποίηση	Περίπλοκο μέσο
Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις		
Πρωτεΐνες (MW)	<30 kDa	>100 kDa
Ειδικές συνθήκες	Καμία	Χρήση ειδικού επωαστήρα

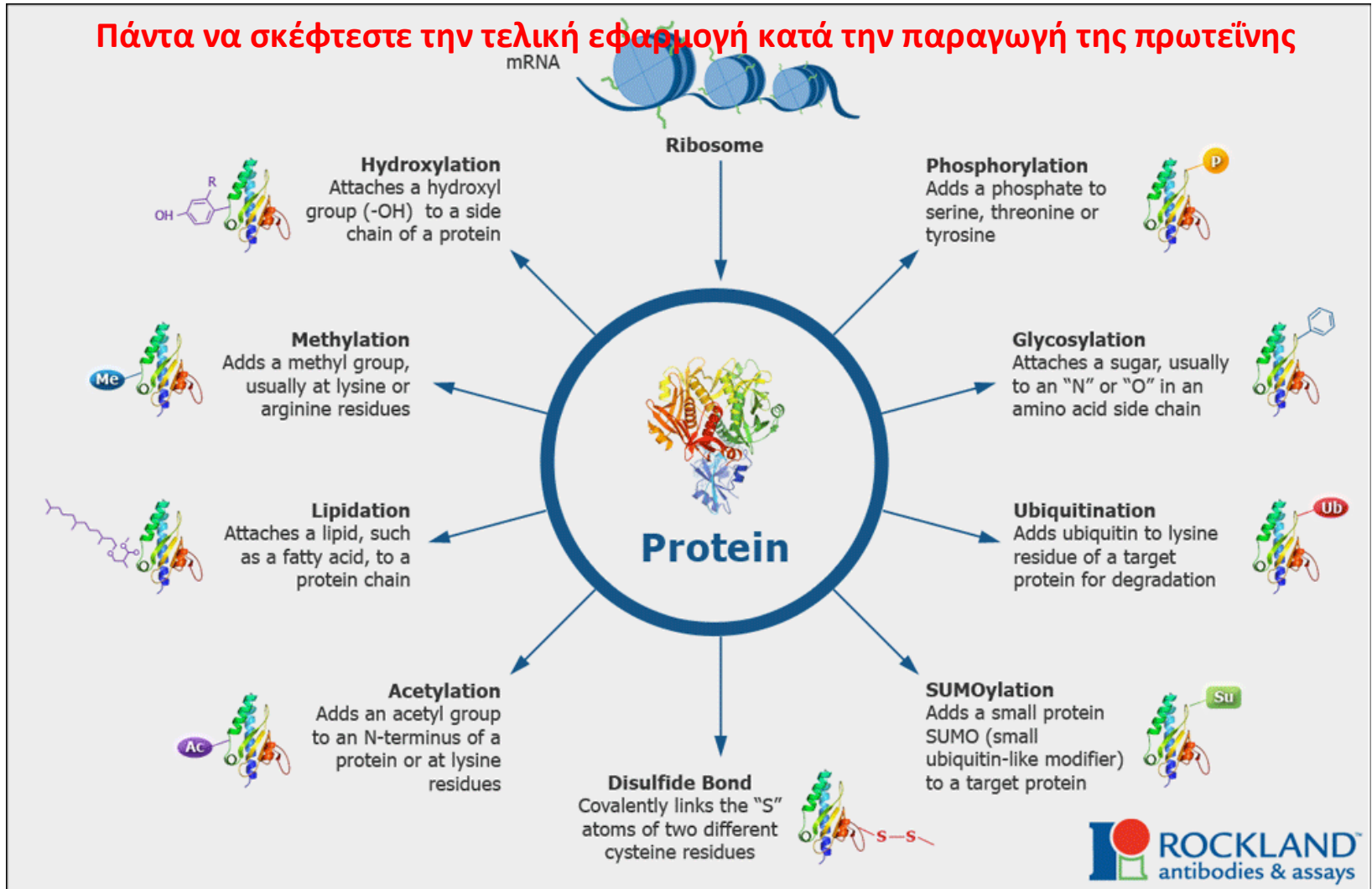
Σύγκριση

	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
GOVERNMENT REGULATION	 Transgenics	 Plants	 Insect	 Yeast	 Bacteria	 Mammalian

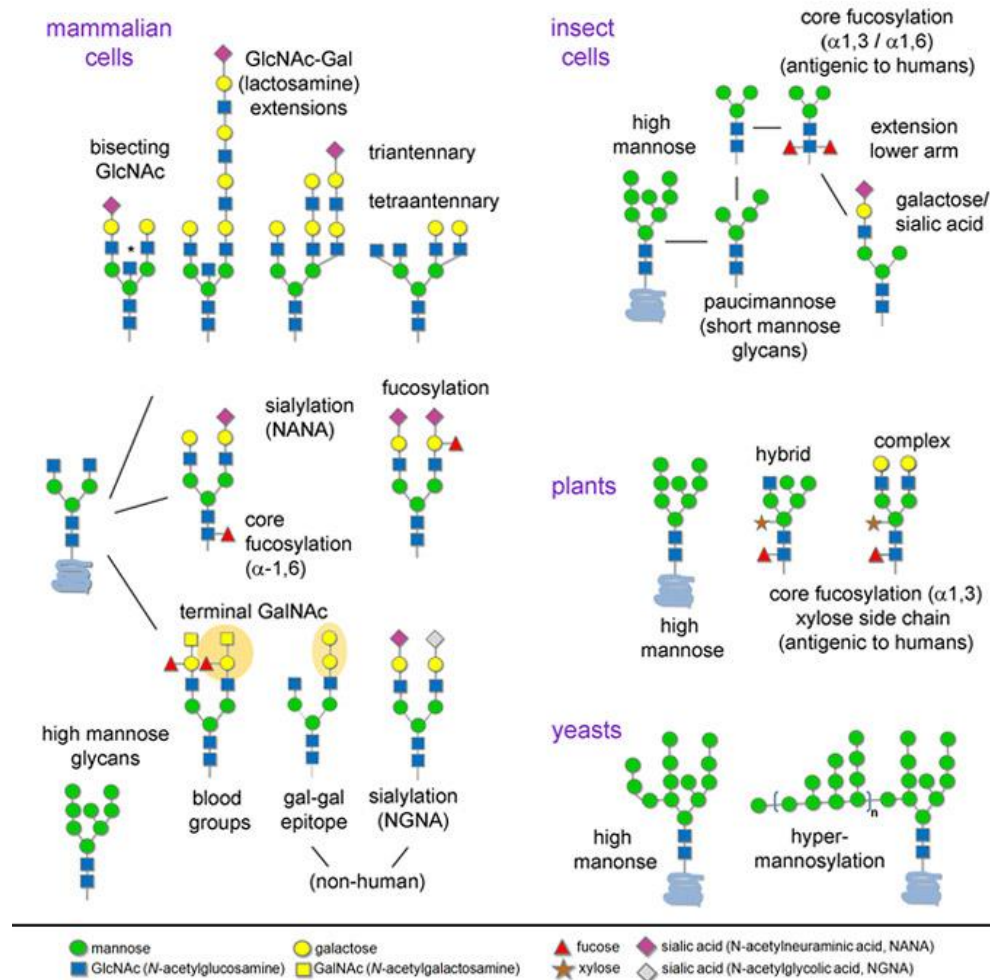
Organisms	Growth and culture condition	Genetic transformation	Posttranslational modification	Expression efficiency	Cost
Prokaryote					
<i>E. coli</i>	Fast and high efficiency, simple media requirement	Well-defined, simple, and high efficiency	No posttranslational	High without efficient secretion	Low cost
<i>Bacillus subtilis</i>	Fast, high efficiency, and safe	Convenient for gene modification	Almost none	High yield with secretory expression and produces no lipopolysaccharide	Low cost
Eukaryote					
<i>S. cerevisiae</i>	Fast and high efficiency, easy scale-up	Well-established manipulation	Yes but hyperglycosylation	Moderate and mannosylation of secreted proteins	Low cost
<i>Komagataella pastoris</i>	High cell density, easy scale-up	Well-established manipulation	Yes but hyper-mannosylation	Moderate of secreted proteins	Low cost
Filamentous fungi	Fast and high efficiency	Complex manipulation and lower transformation efficiency	Typical eukaryotic posttranslational modifications	High and efficiency secretion	Low cost
Plant cell	Safe and efficacious	Complex manipulation, long period, and lower transformation efficiency	Tailor-made glycans	High expressing	Cost and potential contamination with microorganisms
Insects	Safe for vertebrates, more demanding culture conditions	Excellent tool for recombinant glycoprotein production	Glycosylation of protein terminal with mannose glycans	High expressing but cannot be expressed continuously	High cost
Mammal cells	Slow growth and expensive nutrient requirement, limited large-scale industrial production	Complicated technology	Proper protein folding, posttranslational modifications	Moderate	High cost and potential contamination with animal viruses

Μετα-μεταφραστική τροποποίηση

Πάντα να σκέφτεστε την τελική εφαρμογή κατά την παραγωγή της πρωτεΐνης



Διαφορές στην γλυκοζυλίωση



Αναφορές

- ❖ Βιοχημεία – Stryer
- ❖ Ενζυμική Τεχνολογία – Ι. Κλώνης (ή Ενζυμολογία – Ι. Κλώνης)
- ❖ Βιοτεχνολογία - Κυριακίδης
- ❖ Στελέχη βακτηρίων για έκφραση <http://wolfson.huji.ac.il/expression/bac-strains-prot-exp.html>
- ❖ Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **82**(1): 240-251.
- ❖ Prinz et al. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**(25): 15661-15667
- ❖ de Marco, A. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **8**: 26.
- ❖ Denoncin, K. and J. F. Collet (2013). Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid Redox Signal* **19**(1): 63-71.
- ❖ http://parts.igem.org/Help:Bacillus_subtilis/Advantages_and_disadvantages
- ❖ Maarten van Dijl J., Hecker M. (2013) *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to supersecreting cell factory. *Microb Cell Fact* **12**: 3.
- ❖ Siggers K.A., Cammie F.L. (2008), The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A Versatile Model System for the Identification and Characterization of Bacterial Virulence Proteins. *Cell Host Microbe* **4**(1): 8-15
- ❖ Demain, A.L. & Vaishnav, P. (2009): Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* **27**(3): 297-306.
- ❖ Kartse, K., Bleckmann, M., van den Heuvel, J. (2017): Not Limited to *E.coli*: Versatile Expression Vectors for Mammalian Protein Expression. *Methods Mol Biol.* **1586**: 313-324.