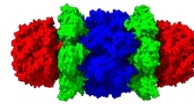


Vectori utilizați în ingineria genetică. Producerea proteinelor recombinante



Elementul cheie ce asigură livrarea unei molecule de ADN recombinat și replicarea acestuia într-o celulă gazdă este reprezentat de **vector**. Un vector **este o moleculă de ADN capabilă se replice independent de cromozom(i) organismului gazdă sau să integreze în ADN-ul genomic al acestuia, realizând propriu-zis „transportul” unei secvențe de ADN „noi/străine” din exterior către interiorul organismului gazdă, sau între organisme gazdă.** Termenul de vector are de asemenea și sensul structurii ce asigură „transportul / vehicularea” unei secvențe de ADN de-a lungul tuturor etapelor / metodelor implicate în procesul de inginerie genetică.

De-a lungul timpului au fost creați diverși vectori cu roluri specifice. Dintre cei mai importanți vectori trebuie menționați:

A. Vectorii plasmidiali sau plasmidele

Plasmidele sunt molecule de ADN circular ce se replică independent de cromozomul bacterian. Plasmidele sunt vectori ce apar în mod natural au dimensiuni cuprinse între 5,000 și 400,000 pb, dar există și numeroase plasmide artificiale, create de cercetători. Plasmidele pot fi preluate celulele bacteriene printr-un proces de **transformare** sau injectate cu ajutorul curentului electric printr-un proces numit **electroporare**.

Ambele procese au randament scăzut, puține celule preluând de fapt plasmidul. E necesar din acest motiv un mecanism de selecție a celulelor ce conțin plasmidul. Cea mai frecventă strategie este de a utiliza plasmizi ce conțin o genă esențială organismului gazdă în anumite condiții – genă numită **marker de selecție**. Un exemplu de asemenea marker este o genă pentru rezistența la antibiotic – pe medii cu antibiotic, doar celulele conțin plasmidul cu markerul se vor dezvolta și vor fi astfel selectate. Un exemplu de vector plasmidial este pBR322.

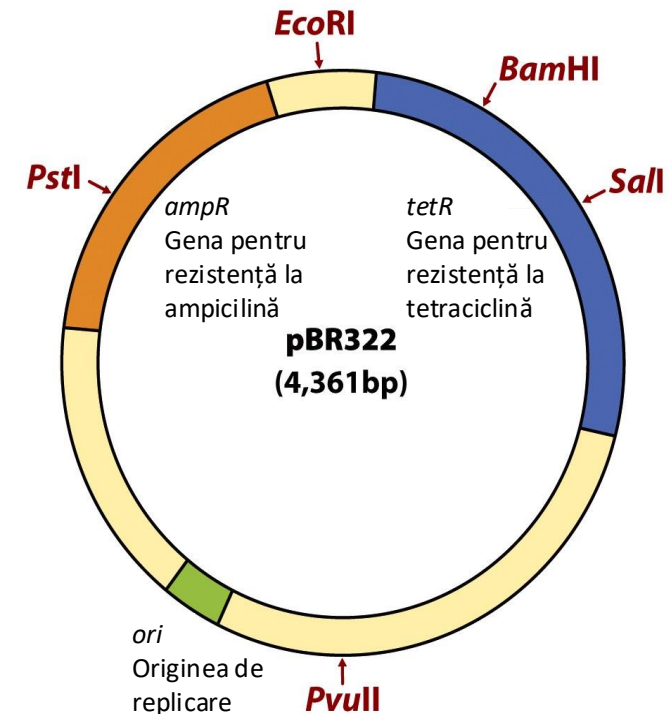


Figure 9-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

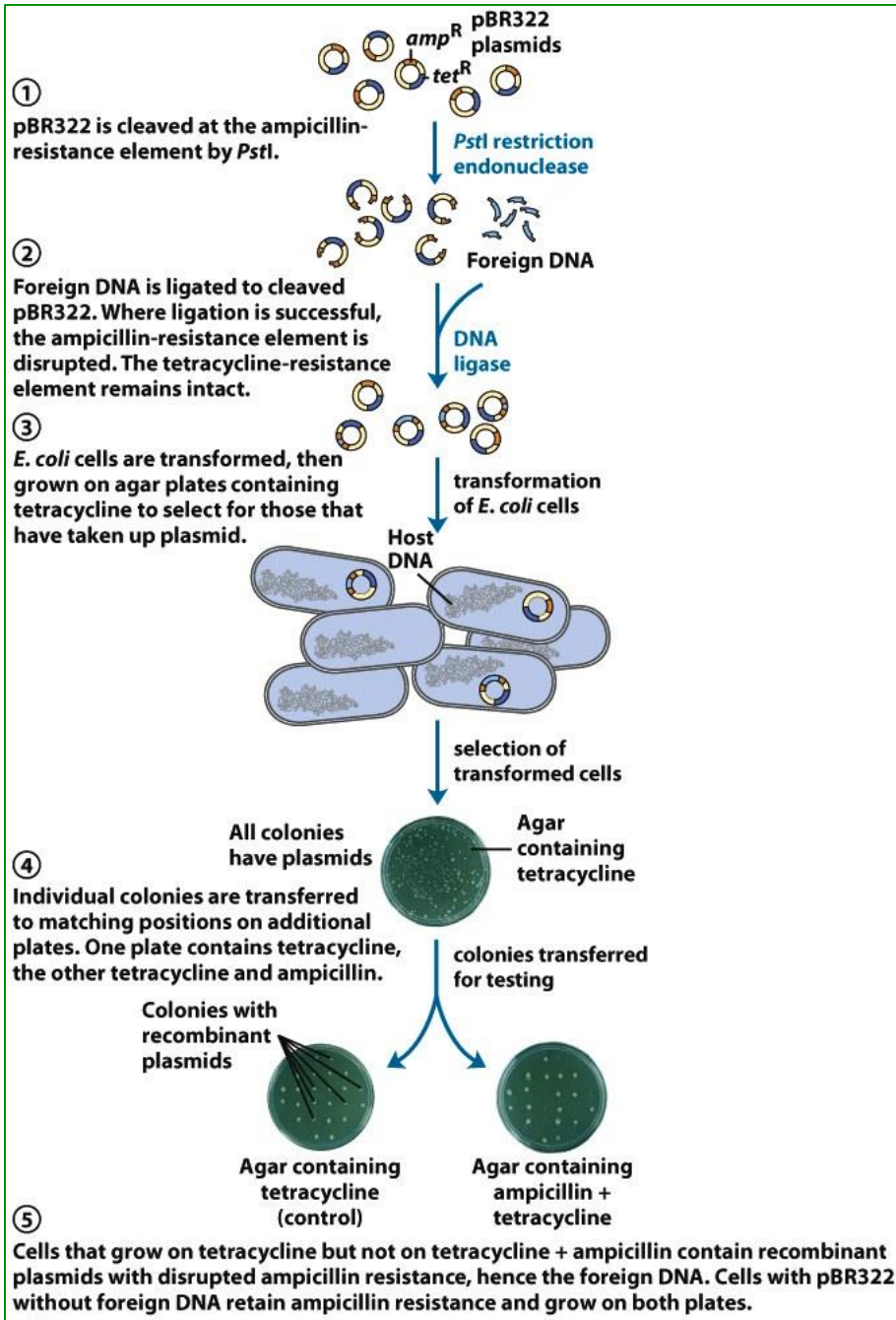


Figure 9-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

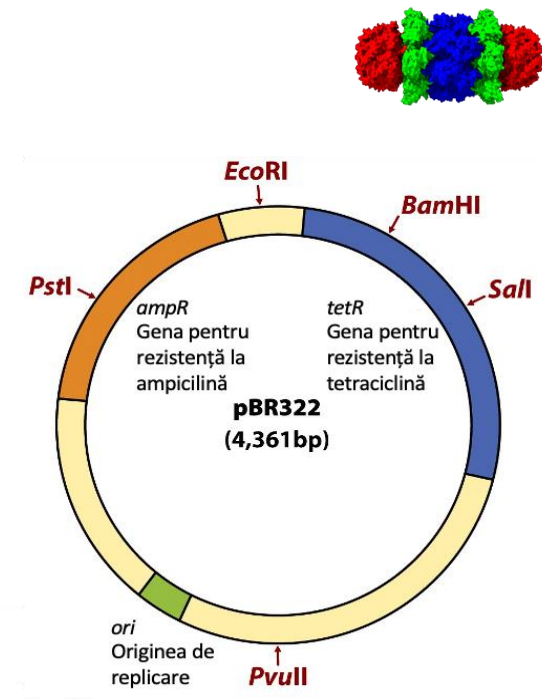
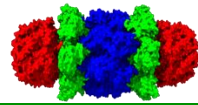


Figure 9-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company



Vectori utilizați în ingineria genetică

B. Bacteriofagii

Bacteriofagul λ este un virus capabil să infecteze celule de *E. coli* și a injecteze propriul său ADN de 48502 pb în celula bacteriană. Fagul a fost modificat și a devenit un vector eficient de transfer a fragmentelor mari de ADN în celulele de *E. coli*. Utilizarea sa ca vector se bazează pe două aspecte cheie:

1. Aproximativ o treime din genomul fagului este neesențial și poate fi înlocuit cu ADN străin;
2. ADN-ul fagului este împachetat într-o particulă virală funcțională doar dacă are dimensiunea cuprinsă între 40,000 și 53,000 pb;

Cercetătorii au creat astfel vectori bacteriofagici ce pot fi clivați în 3 fragmente distincte: două fragmente ce conțin gene esențiale și care au împreună 30000 pb și un al treilea fragment „de umplutură”, amplasat între fragmentele esențiale și care poate fi înlocuit cu succes cu orice alt fragment de ADN.

Vectorii bacteriofagici permit clonarea unor fragmente de până la 23,000 bp. Între cele două fragmente esențiale poate fi astfel ligat fragmentul ADN „nou/străin” pentru a produce fragmente de ADN fagic recombinat. După ce fragmentele esențiale sunt ligate cu ADN-ul străin, amestecul de ligare este introdus într-un extract complet de celule de *E. coli* ce conține toate componentele necesare pentru a reface particulă virală printr-un proces numit **împachetare *in-vitro***. Însă, doar acele molecule de ADN ce conțin fragmentele esențiale și ADN-ul de interes vor și împachetate în particule virale complete și deci vor fi capabile să infecteze noi celule de *E. coli*.

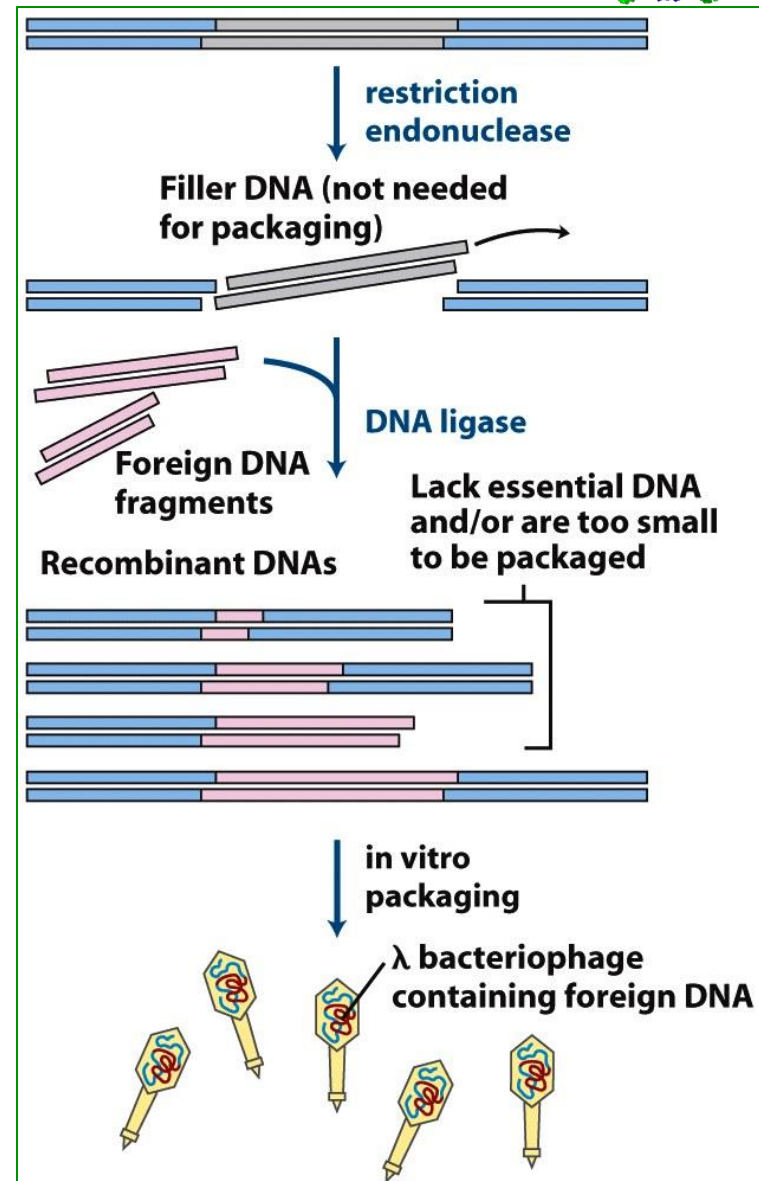


Figure 9-5
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Vectori utilizați în ingineria genetică

C. Cromozomii bacterieni artificiali (BAC, Bacterial Artificial Chromosome)

BAC sunt plasmide create special pentru a permite clonarea de fragmente foarte lungi de ADN, în general între 100000 și 300000 pb. În general acești vectori includ markeri de selecție cum ar fi rezistența la antibioticul cloramfenicol (*cmR*) și o origine de replicare ce menține plasmidul în o copie/ celulă (asemănător cromozomului bacterian).

D. Cromozomii artificiali pentru drojdii (YACs, Yeast Artificial Chromosomes)

Vectorii YACs conțin toate elementele necesare pentru a funcționa ca un cromozom eucariot în nucleul unei celule de drojdie: o origine de replicare ce funcționează în drojdie, doi markeri de selecție și secvențe specializate derivate din telomeri și centromer. Înainte de a fi utilizat în drojdie, un vector YAC este replicat ca un plasmid circular în bacterii. Printr-o digestie cu endonucleaze, din molecula de ADN circular se obțin două fragmente de ADN numite „brațe” ce au fiecare câte un marker selectabil și propriile secvențe telomerice. Fragmente de ADN de clonat, de dimensiuni până la 2×10^6 pb sunt amestecate cu brațele vectorului și ligate, amestecul de ligare fiind apoi utilizat pentru a transforma celule de drojdie. Pe medii ce conțin ambele antibiotice vor crește astfel doar acele celule ce conțin YACs cu brațele flankând ADN-ul de interes. Stabilitatea de lungul generațiilor a YAC crește odată cu dimensiunea, comportându-se asemănător unor cromosomi normali.

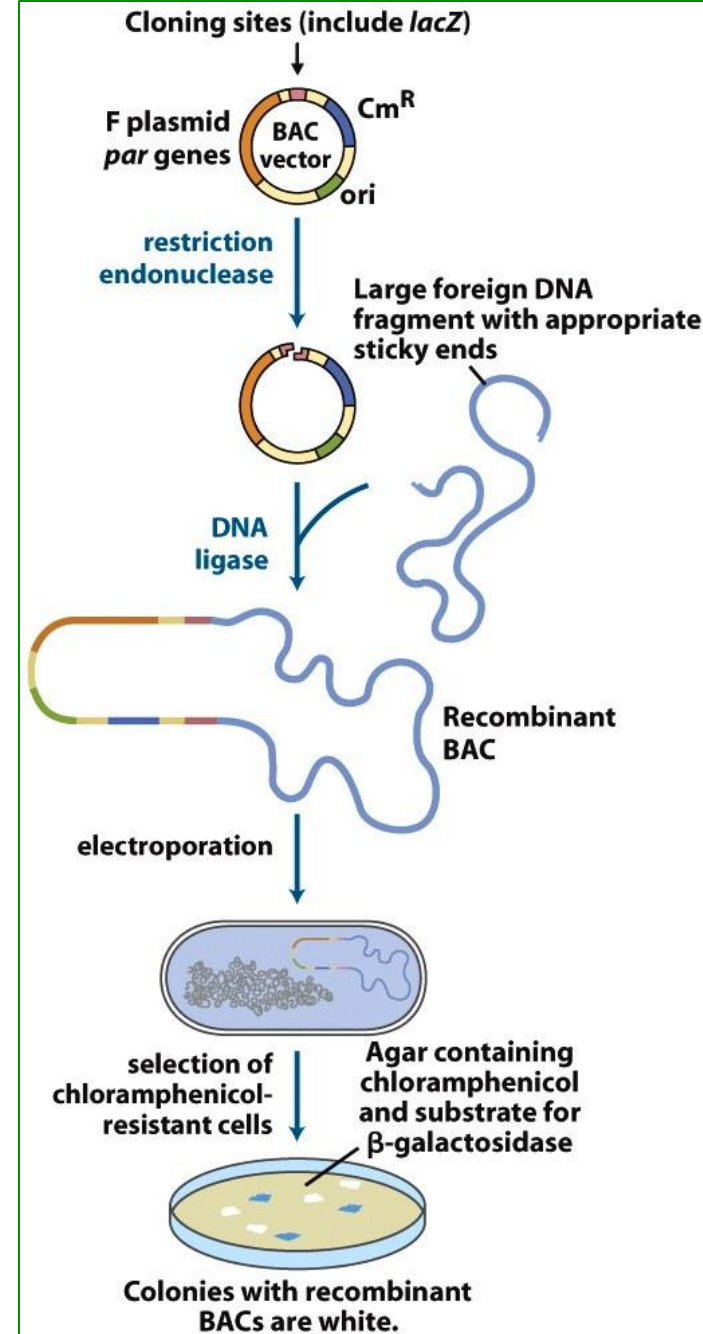


Figure 9-6

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Pagina 5 din 27

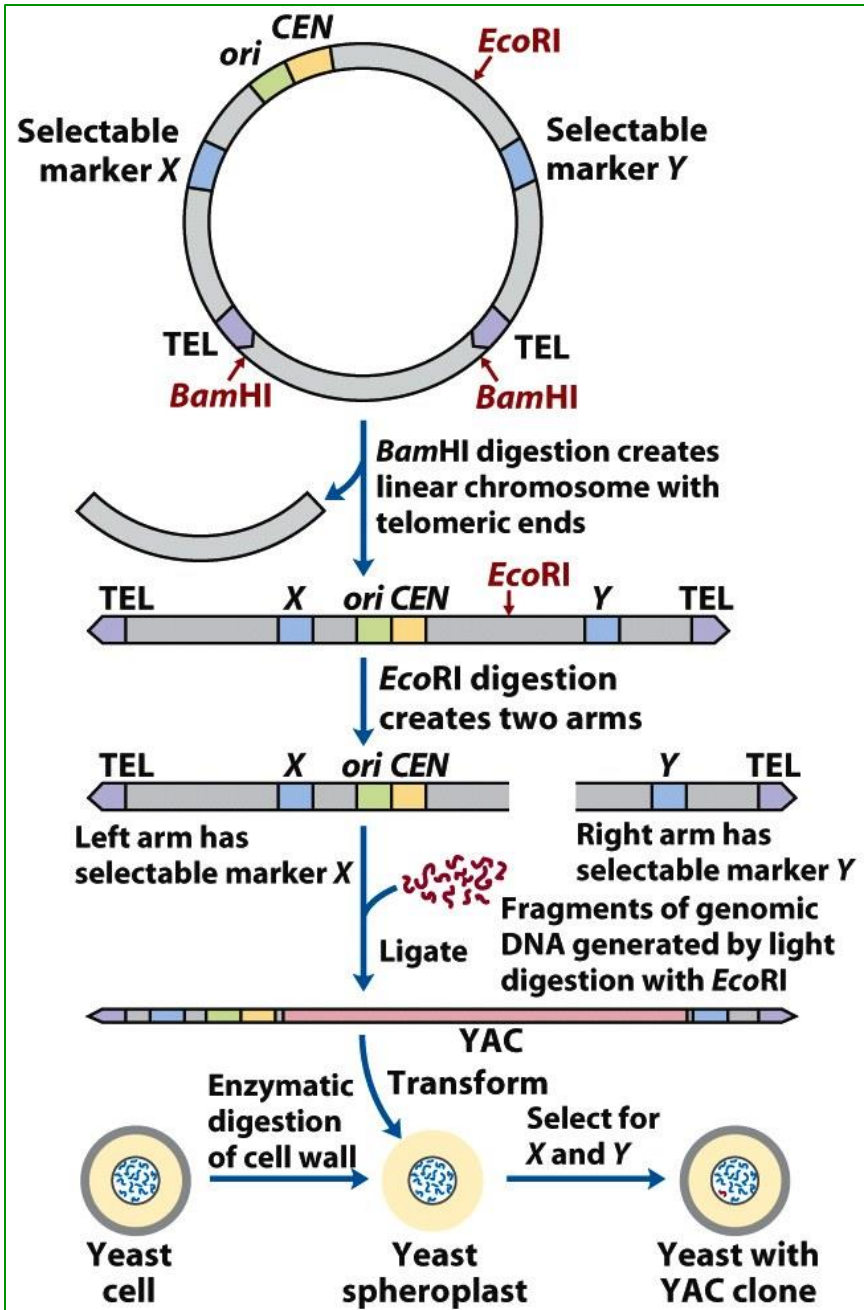
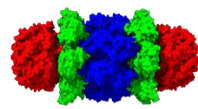
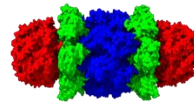


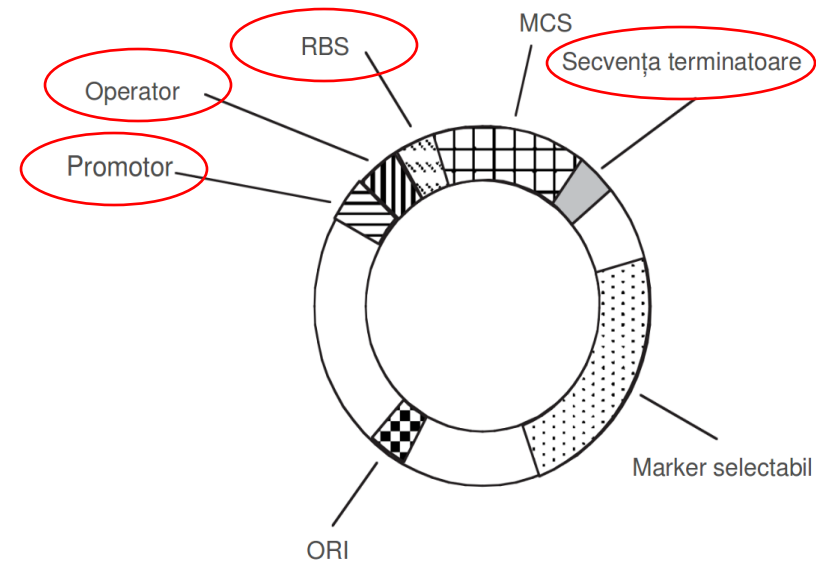
Figure 9-7
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



De cele mai multe ori produsul unei gene clonate și nu gena în sine este de interes, în special când proteina are valoare comercială, terapeutică sau este necesară în procesul de cercetare.

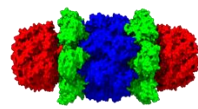
Clonarea unui fragment de ADN într-un vector permite izolarea și multiplicarea respectivului fragment odată cu vectorul. Dacă fragmentul conține toată regiunea codificatoare a unei gene, informația genetică conținută de CDS poate fi utilizată pentru a sintetiza proteina codificată. Cel mai frecvent fragmentul clonat este pus sub controlul **secvențelor reglatoare existente pe plasmidul de expresie**. Acest lucru permite controlul strict al momentului și nivelului de expresie a genei clonate. Secvențele reglatoare din structura plasmidelor de expresie sunt obținute prin inginerie genetică și permit atingerea unor nivele de expresie ce depășesc viteza de sinteză nativă din celule. Din acest motiv, spunem despre genele clonate că sunt **supraexprimate**.

În procesul de clonare cele mai frecvent CDS suferă mici modificări (prin crearea situsurilor de restricție de exemplu), de proteinele produse vor avea o secvență diferită de cele native – **proteine recombinante**.



Structura unui plasmid de expresie

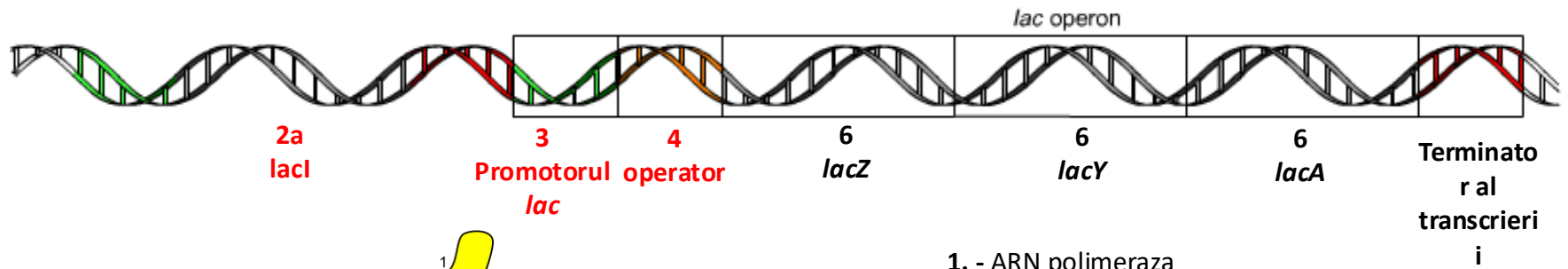
Exprimarea genelor clonate



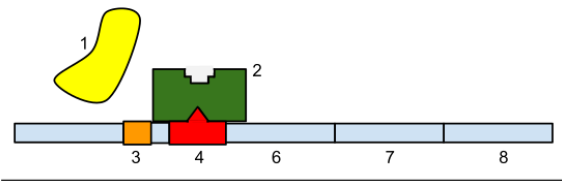
De departe cel mai folosit sistem pentru supraexpresia și obținerea proteinelor recombinante este bacteria *E. coli*, datorită faptului că necesită pentru cultivare o dotare foarte simplă și medii de cultură relativ ieftine.

Supraexpresia unei proteine recombinante în *E. coli* este strict dependentă de vectorii plasmidiali de expresie. Gena clonată în acești vectori este pusă sub controlul unui promotor puternic ce permite o verificare foarte strictă a intensității și momentului expresiei. Cei mai importanți promotori utilizabili în *Escherichia coli* sunt *lac*, *tac* și *lacUV5* din sistemul T7.

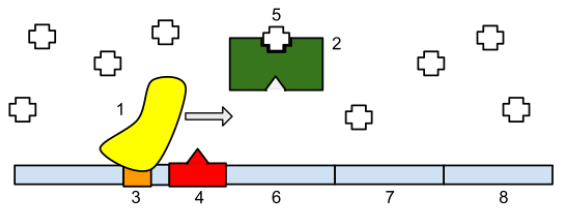
Structura și funcționarea operonului *lac*



Operonul *lac* represat



Operonul *lac* activat



- 1. - ARN polimeraza
- 2 – represorul *lacI*, codificat de 2a
- 3 – promotorul operonului *lac*
- 4 - operator
- 5 – lactoză sau IPTG
- 6, 7, 8 – orf-uri ce codifică enzime din calea de degradare a lactozei

În procesul de clonare genele pot fi de asemenea alterate

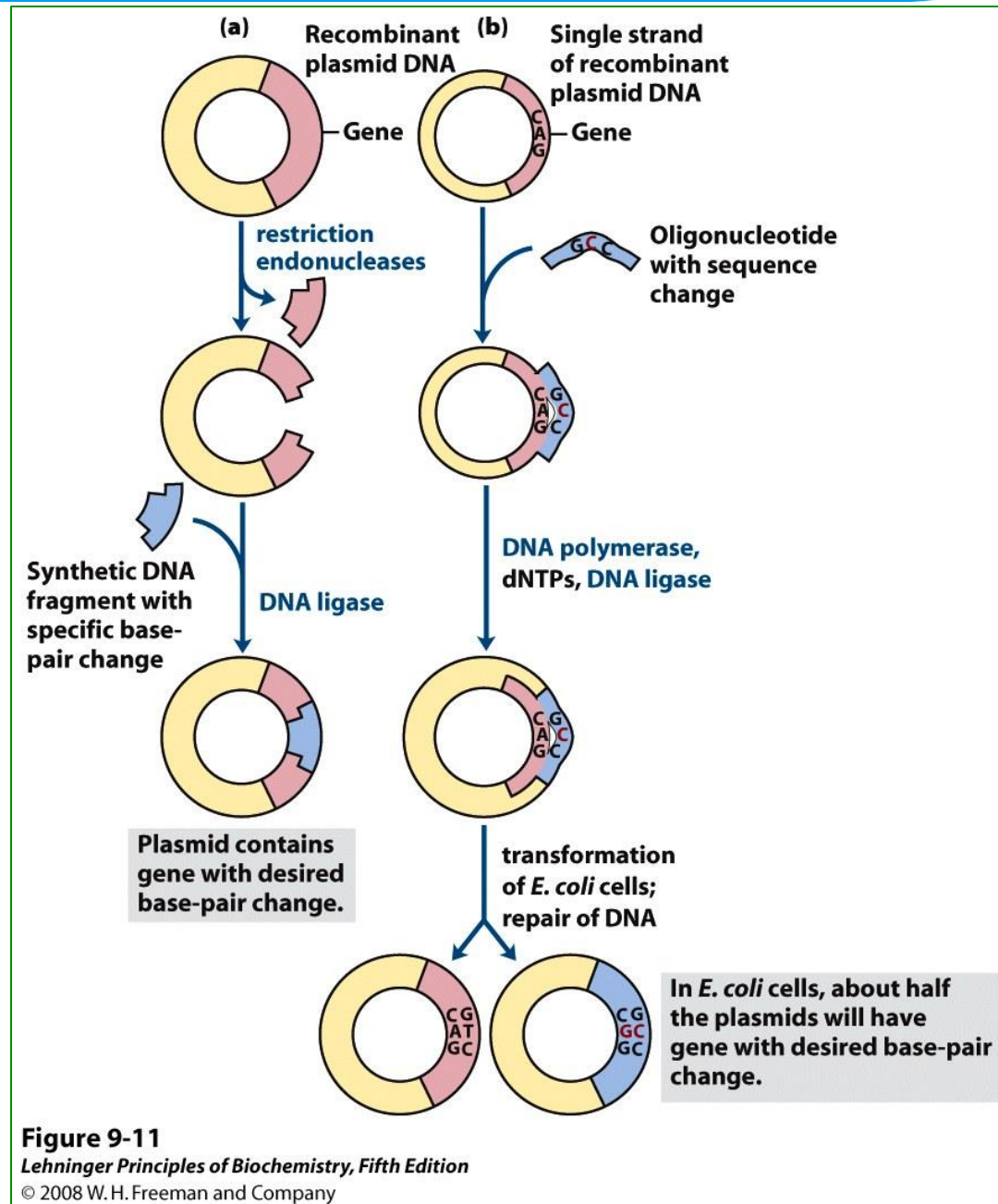
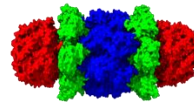
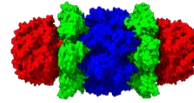


Figure 9-11

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

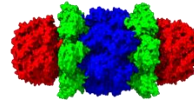


Un promotor este absolut necesar, dar nu și suficient pentru a asigura un nivel bun de expresie al unei proteine exogene. Alte 2 componente necesare pentru asigurarea expresia unei proteine recombinante în *E. coli* sunt:

1. **existența unui semnal de terminare a transcrierii eficient**, ce asigură o mai mare stabilitate a ARN-ului mesager;
2. **diminuare procesele de proteoliză**. *E. coli* prezintă numeroase sisteme proteazice localizate în citoplasmă, periplasmă sau asociate cu membranele externă și internă care au rolul de a inactiva proteinele exogene. Utilizarea unor tulpini de *E. coli* modificate genetic precum BL21, alături de cultivarea la temperaturi scăzute sunt două abordări care pot fi utilizate pentru a diminua neajunsurile fenomenelor de proteoliză.

E. coli este un organism procariot și din acest motiv utilizarea sa pentru producerea de proteine din EK prezintă o serie de dezavantaje. Celulele de *E. coli* nu pot procesa introni, nu pot realiza modificări post-transcriere complexe, precum glicozilarea, miristilarea, fosforilarea, nu pot forma un număr mare de punți disulfidice și nu prezintă sistemele specifice de tip chaperones necesare asamblării moleculelor multimerice. Șansele de obținere a unei proteine cu structură tridimensională nativă atunci când este supraexprimată în *E. coli* cresc dacă:

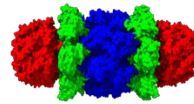
1. **organismul din care provine gena clonată este mai apropiat filogenetic de *E. coli***;
2. **proteina are masă moleculară redusă**, mai mică de 70 kDa;
3. **proteina nu are resturi de cisteină libere**;
4. **proteina nu are mai mult de 3-4 punți disulfidice intramoleculare**;
5. **nu necesită modificări post-transcriere pentru activitate sau solubilitate**.



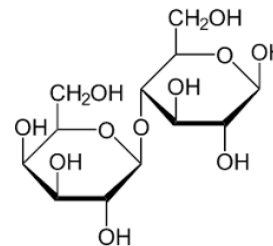
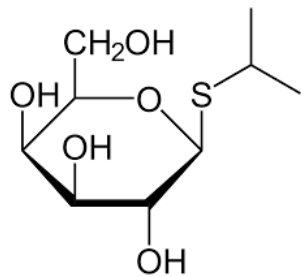
În general, pentru a mări randamentul de purificare și pentru a obține rapid cantități mari de proteină pură este de dorit ca gena clonată să fie exprimată cât mai puternic. Prin utilizarea unor promotori puternici precum *tac* sau *lac*, nivelul de expresie atins este ridicat și poate duce la destabilizarea întregului mecanism de sinteză proteică a celulei bacteriene. Ca măsură de apărare, celulele de *E. coli* depozitează proteina supraexprimată sub forma unor **corpi de incluziune**. Aceștia reprezintă **aglomerări masive cuprinzând, în general, o singură proteină inactivă, depliată**.

Esențial pentru producerea proteinelor recombinante în *E. coli* este realizarea unui echilibru între intensitatea expresiei și solubilitatea acestora. Acest echilibru poate fi controlat prin variația unor parametri de cultivare a microorganismului precum:

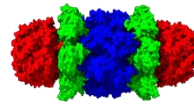
- **temperatura de cultivare** – temperaturi mai joase frânează metabolismul microorganismului și asigură nivele de expresie mai reduse; în general, se pornește de la temperatura de 35°C și se coboară gradual cu câte 2-3°C până la valoarea de 20°C; odată cu reducerea temperaturii perioada de incubare va trebui prelungită;
- **nivelul de agitare** – în timpul cultivării agitarea poate să influențeze solubilitatea proteinei supraexprimate prin nivelul de aerare al culturii care, la rândul său, influențează viteza sintezei proteice; în general, se utilizează o viteză de rotație de 190 rpm care poate fi diminuată, după caz, până la 90 rpm;



- **nivelul de inducere a expresiei** – este controlat prin concentrația de agent inductor adăugat în mediu; pentru promotorii *lac* și *tac* agentul inductor este un derivat artificial al lactozei, izopropil β -D-1-tiogalactopiranozid sau prescurtat IPTG; cel mai frecvent, concentrația de IPTG utilizată în mediul de cultură este 1 mM, dar aceasta poate fi redusă până la 10 μ M;

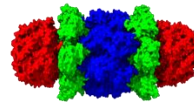


- **compoziția mediului de cultură** – adăugarea în mediul de cultură a unor agenți care produc stres osmotic precum sorbitol sau betaină poate conduce în unele cazuri la îmbunătățirea solubilității unor proteine exprimate sub formă de corpi de incluziune;
- **tulpina de *E. coli* utilizată** – distribuitori precum NEB, Fermentas sau Roche oferă o gamă variată de tulpini de *E. coli* modificate special pentru a permite expresia proteinelor exogene; astfel, tulpina BL21 (DE3) este recunoscută ca fiind mai indicată pentru producerea de proteine recombinante decât XL1 Blue.

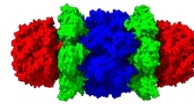


Proteinele se caracterizează printr-o variabilitate mare atât a structurii, cât și a proprietăților specifice. Din acest motiv a fost imposibil până acum să se realizeze un protocol de purificare valabil fără echivoc pentru orice moleculă proteică. Cunoștințele acumulate în domeniul purificării proteinelor au permis cel mult conturarea unor reguli și principii generale de urmat în scopul adaptării unei metode de purificare la proprietățile fizico-chimice ale proteinei de interes.

Revoluția produsă de tehnicile ADN-recombinat în biologia moleculară s-a resimțit în domenii extrem de variate, printre care și cel al purificării proteinelor. Tehnicile de manipulare a ADN-ului permit acum cercetătorului să modifice secvența și implicit structura proteinei de purificat pentru a-i conferi proprietăți specifice care să faciliteze purificarea. În acest sens, una dintre cele mai utilizate tehnici este cea care se bazează **pe atașarea la unul din capetele C sau N terminale ale proteinei de interes a unei „cozi” cu afinitate pentru suporturi immobilizate**. Această „coadă” are dimensiuni variate, putând fi reprezentată fie de un întreg domeniu proteic, fie doar de un fragment de câțiva aminoacizi. Proteina recombinată obținută va prezenta aceiași afinitate ca și „coada” pe care o conține, putând fi astfel purificată prin tehnici specifice



“Cozi” de fuziune	Metodă de purificare
Domenii proteice de fuziune	
MPB ¹	Afinitate față de amiloză
Glutation S-transferaza	Afinitate față de glutation
Proteina A	Afinitate față de IgG
Represorul lac	Afinitate față de operatorul lac
GBP ²	Afinitate față de galactoză
Cozi polipeptidice de fuziune	
Poli-His	IMAC ³
Poli-Asp	Cromatografie pe rășini anionice
Poli-Arg	Cromatografie pe rășini cationice
Poli-Cys	Afinitate pentru grupări tiolice
Strep-tag II	Afinitate pentru avidină sau streptavidină
¹ MBP—engl. Maltose-Binding Proteine ² GBP –engl. Galatose-Binding Protein ³ IMAC –cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate (engl. Immobilized Metal Affinity Chromatography)	

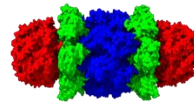


Foarte intens utilizată pentru purificarea proteinelor este așa numita „**coadă poli-His**”, reprezentată printr-o polipeptidă **conținând 6-8 reziduuri de histidină cu afinitate foarte mare pentru Ni²⁺ sau Co²⁺**. Față de celelalte „cozi” proteice sau polipeptidice, polipeptida poli-His are marele avantaj al dimensiunilor deosebit de mici. Aceasta face ca modificările aduse structurilor secundare și terțiare ale proteinei de purificat să fie minime și, drept urmare, modificările activității enzimatică native a proteinei purificate să fie extrem de reduse. Au fost semnalate și cazuri foarte rare în care coada are un efect benefic, măbind activitatea proteinei. Deși nu foarte frecvent, au fost raportate și situații în care efectul este unul negativ, ducând la diminuarea activității biologice.

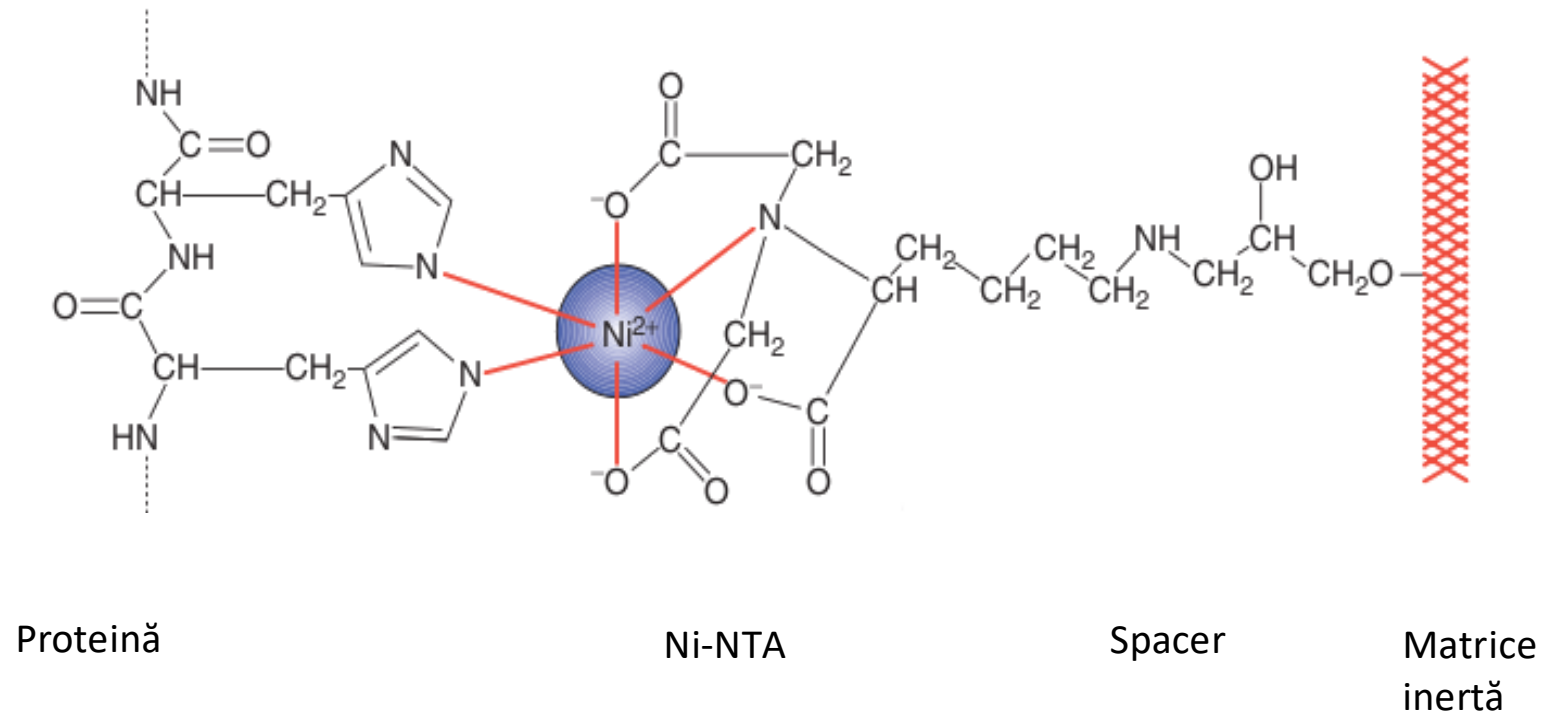
Tehnica de purificare care se bazează pe „coada” polipeptidică poli-His a fost descrisă pentru prima dată în anul 1975 și se bazează pe afinitatea pentru metalele tranziționale pe care această coadă o conferă proteinelor recombinante. Denumirea metodei de purificare este **cromatografie de afinitate pentru metale immobilizate** (engl. **Immobilized Metal Affinity Chromatography –IMAC**).

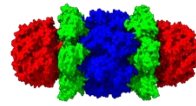
Întreaga separare cromatografică are la bază o matrice inertă pe care sunt imobilizați ionii unor metale tranziționale (Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ sau cel mai frecvent Ni²⁺). Matricea suport este confecționată dintr-un material puternic hidrofil, inert din punct de vedere chimic și rezistent la atacul microorganismelor. Materialele cel mai frecvent utilizate pentru suportul cromatografic sunt **agaroză** și **Sephadex-ul** sub forma unor fragmente sferice, rigide și uniforme cu diametrul de 5-50 μm. Pe acest suport se fixează covalent **o grupare ce are proprietatea de a chelata ionul metalic**.

Purificarea proteinelor prin IMAC



Prima grupare chelatantă descrisă a fost **acidul nitrilotriacetic (NTA)**, grupare ce este utilizată foarte frecvent și astăzi. NTA are 4 situsuri de coordinare și poate astfel lega foarte puternic ionii metalelor tranziționale. Suportul cromatografic cunoscut comercial sub denumirea de Ni-NTA se obține prin imobilizarea ionilor Ni^{2+} pe NTA. Prin legarea sa de matricea inertă, ionul Ni^{2+} își ocupă patru din cele șase valențe, celelalte două valențele rămase libere putând interacționa cu inelul imidazolic al resturilor de histidină de pe catena polipeptidică sau de pe coada poli-His.

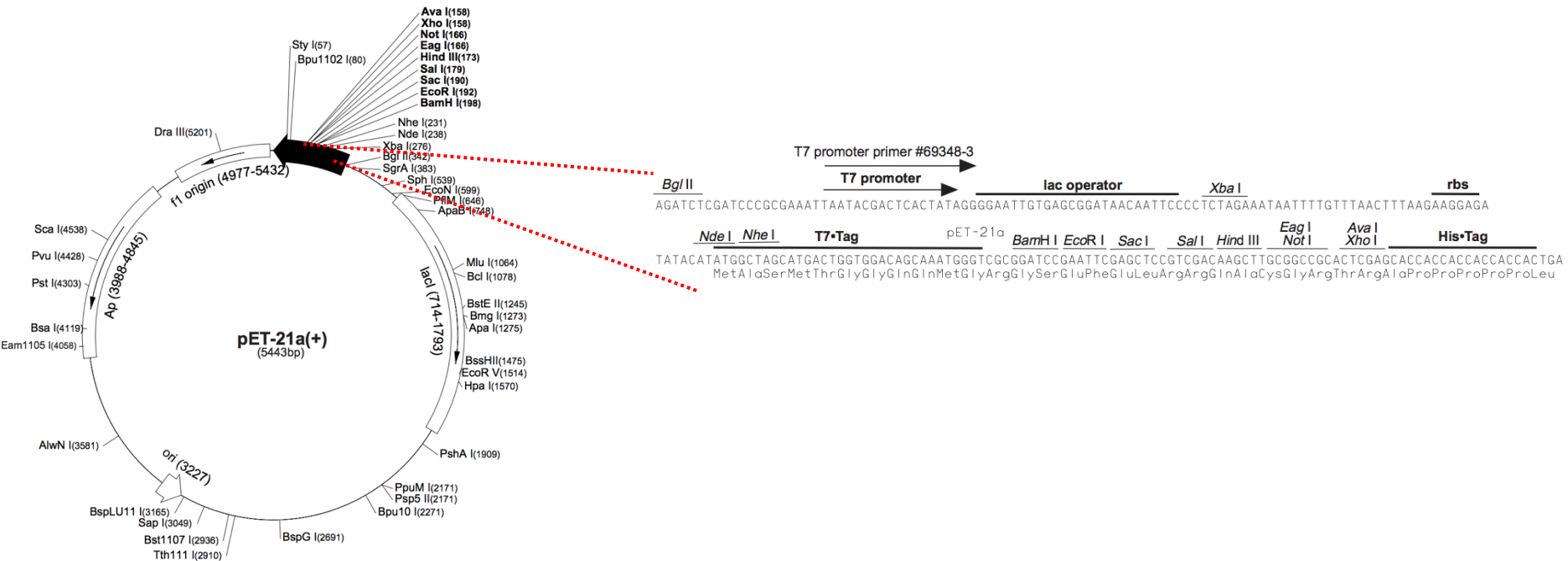




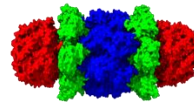
Purificarea proteinelor prin IMAC

Purificarea unei proteine recombinante prin IMAC presupune parcurgerea a **trei etape** distincte:

1. **clonarea genei care codifică proteina de interes în vectori de expresie specifici**– permite nu doar modificarea secvenței de aminoacizi a proteinei de interes în scopul introducerii cozii poli-His, ci și expresia ei controlată în organisme gazdă specifice (cel mai frecvent *E. coli*);

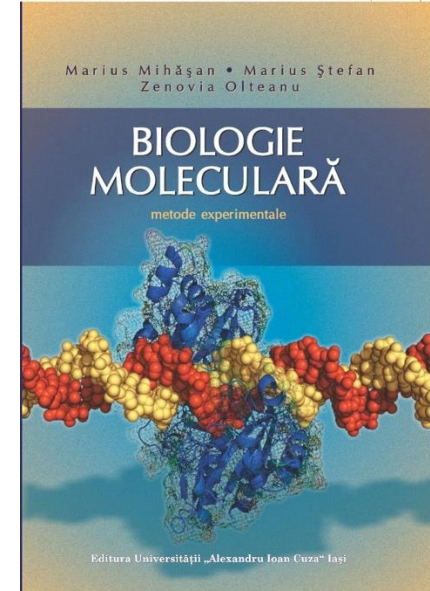


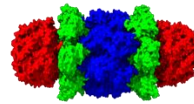
Vector ce permite expresia proteinelor recombinante cu o coadă polihistidinică și structura MCS



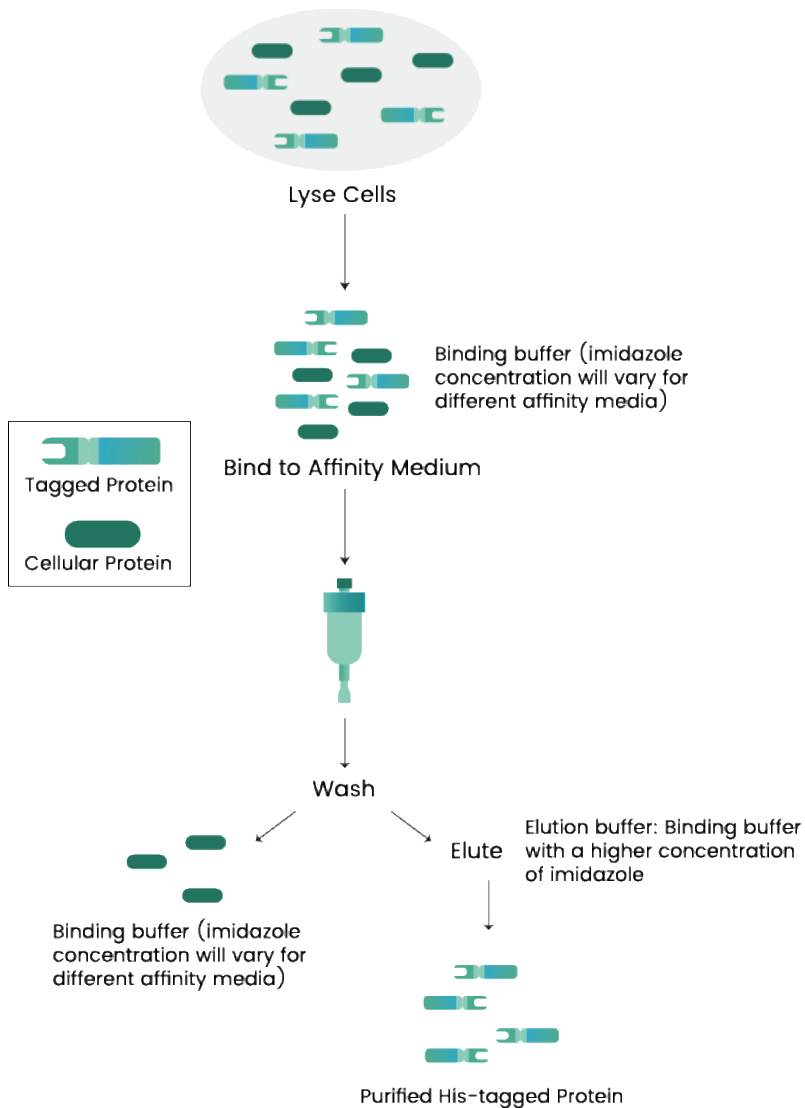
- 2. identificarea condițiilor optime de supraexpresie a proteinei recombinante în organismul gazdă și testarea solubilității acesteia** – supraexpresia în organisme gazdă, altele decât cel din care provine proteina de interes, permite acumularea acesteia și obținerea unui randament de purificare bun; dezavantajul este că, uneori, pot apărea probleme privind stabilitatea și mai ales solubilitatea proteinei de interes; din acest motiv este esențială o etapă de selecție a condițiilor optime de expresie;
- 3. expresia și purificarea propriu-zisă** – în funcție de solubilitatea proteinei țintă, purificarea prin IMAC se poate realiza în condiții native sau în condiții denaturante; în acest ultim caz, după purificare, este necesară introducerea unei etape suplimentare de repliere a proteinei în forma sa nativă.

Metode detaliate pentru fiecare dintre aceste etape sunt prezentate pe larg în Marius Mihășan, Marius Ștefan, Zenovia Olteanu - Biologie Moleculară. Metode experimentale, Editura universității Alexandru Ioan Cuza din Iași; ISBN: 978-9737038166, pg. **181-201**





Schema generală a purificării pp-zise prin IMAC



Avantaje:

- permite purificarea unor cantități de proteină de ordinul miligramelor;
- permite obținerea unui nivel de puritate foarte mare (90-95%) prin aplicarea unei singure etape de cromatografie;
- proteinele purificate au structura tridimensională nativă și funcția intacte.

Limitări:

- pentru a mări afinitatea cozii poli-His față de Ni^{2+} , faza mobilă are un conținut relativ mare de NaCl ceea ce poate duce la precipitarea unor proteine solubile prin fenomenul de salting-out;
- eluția se realizează cu imidazol în concentrații relativ mari (200-500 mM) ceea ce poate duce la precipitarea proteinei izolate; de asemenea, imidazolul este un puternic inhibitor al unor enzime precum monoamin-oxidazele;