

Izražanje v evkariontskih sistemih - splošno

Prednosti: posttranslacijske modifikacije, evkariontska zaporedja niso citotoksična, pravilno zvitje proteinov in oblikovanje disulfidnih vezi

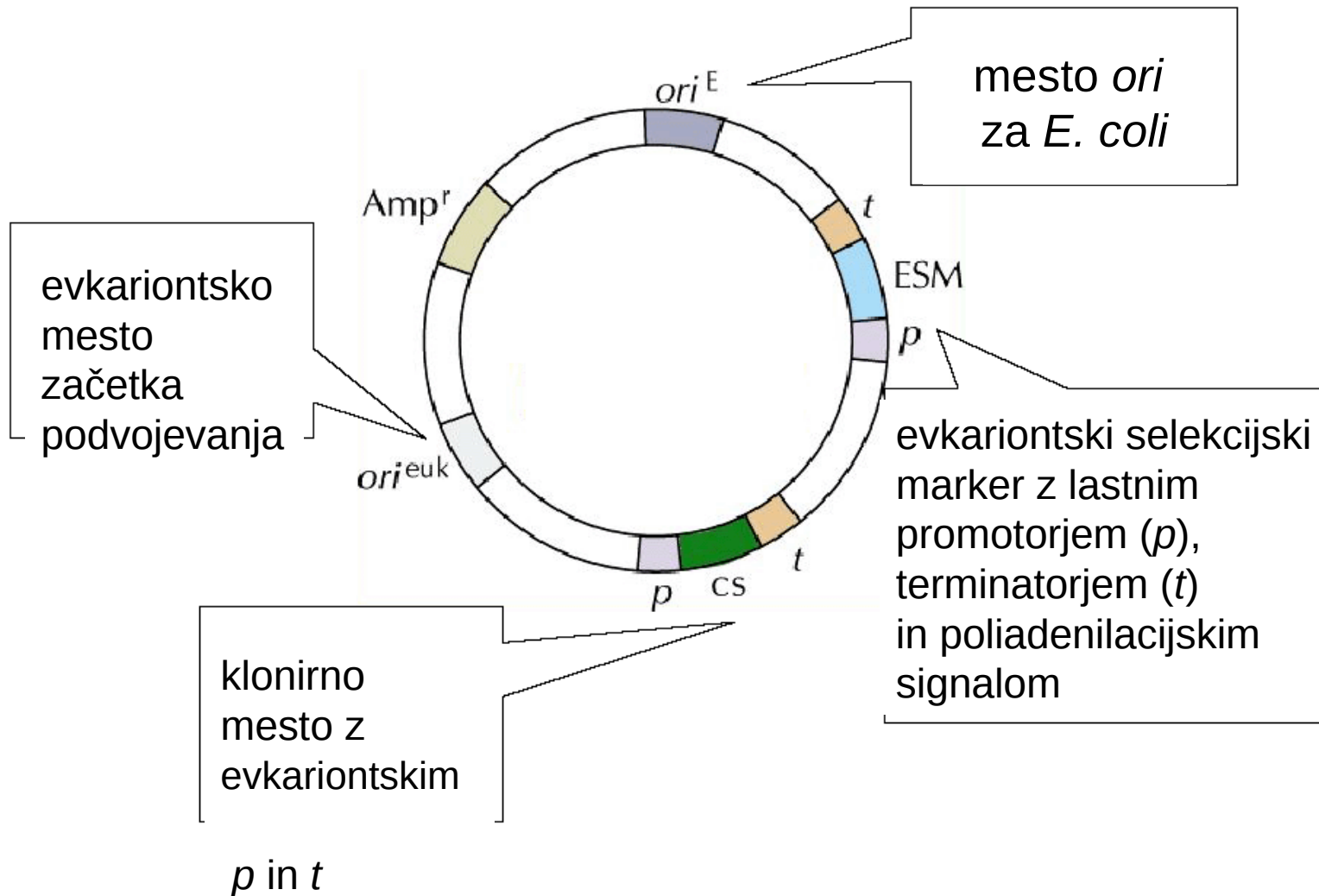
Slabosti: dražja oprema in gojišča, večja nevarnost okužb, bolj zapleteni sistemi, aktivacija prekurzorjev

Vektorji morajo imeti:

- selekcijski gen
- *evkariontski promotor*
- transkripcijski in translacijski stop-signal
- poliadenilacijski signal

Vektorji, ki delujejo kot plazmidi, imajo še ustrezno mesto *ori*, integracijski vektorji pa komplementarna zaporedja, preko katerih pride do prenosa na kromosom.

Večina ekspresijskih vektorjev za evkariontske sisteme je prenosljivih: kloniranje opravimo v *E. coli*, v evkariontsko celico pa nato vnesemo že pripravljen konstrukt.



Izražanje v evkariontskih sistemih /2

Vnos vektorja v gostiteljsko celico: transformacija / transfekcija.

Transformacija kvasovk:

- z elektroporacijo
- preko protoplastov
- s kemično modifikacijo sten (Li-acetat)

Transfekcija gojenih celic višjih organizmov:

- kationski lipidi
- koprecipitacija DNA (DEAE-dekstran ali Ca-fosfat)
- elektroporacija

(izraz transformacija uporabljamo za rakaste spremembe sesalskih celic)

Kvasovke so za gojenje bolj enostavne kot druge glive ali višji evkarionti, zato obstaja več izdelanih ekspresijskih sistemov zanje. Nitaste glive so bolj primerne za proizvodnjo proteinov na veliko, vendar je uspešnih rekombinantnih proizvodov še malo (več patentov kot člankov).

Kvasovka *S. cerevisiae*

Prednosti: (ZDA) **GRAS** (*generally recognized as safe*) enocelični evkariont – posttranslacijske modifikacije so možne, podrobno raziskana genetika in fiziologija, biotehnološko uporabna, izloča malo lastnih proteinov, a jo lahko pripravimo do tega, da izloča rekombinantni protein, obstajajo močni promotorji in naravni plazmid (2 μ), ki je uporaben kot osnova za ekspresijske vektorje.

S. cerevisiae so že zgodaj uspešno uporabili v biotehnološki proizvodnji cepiv (površinski antigen virusa hepatitisa B), diagnostičnih antigenov (proteini HIV) in terapevtskih proteinov (rastni faktorji, insulin, faktor XIIa).

Vektorji:

- plazmidi (nestabilni sistemi pri velikih volumnih (>10 l))
- integracijski vektorji (stabilno, a le 1 kopija/kromosom)
- YAC (za dolge segmente DNA; >100 kb)

Kvasovka *S. cerevisiae* /2

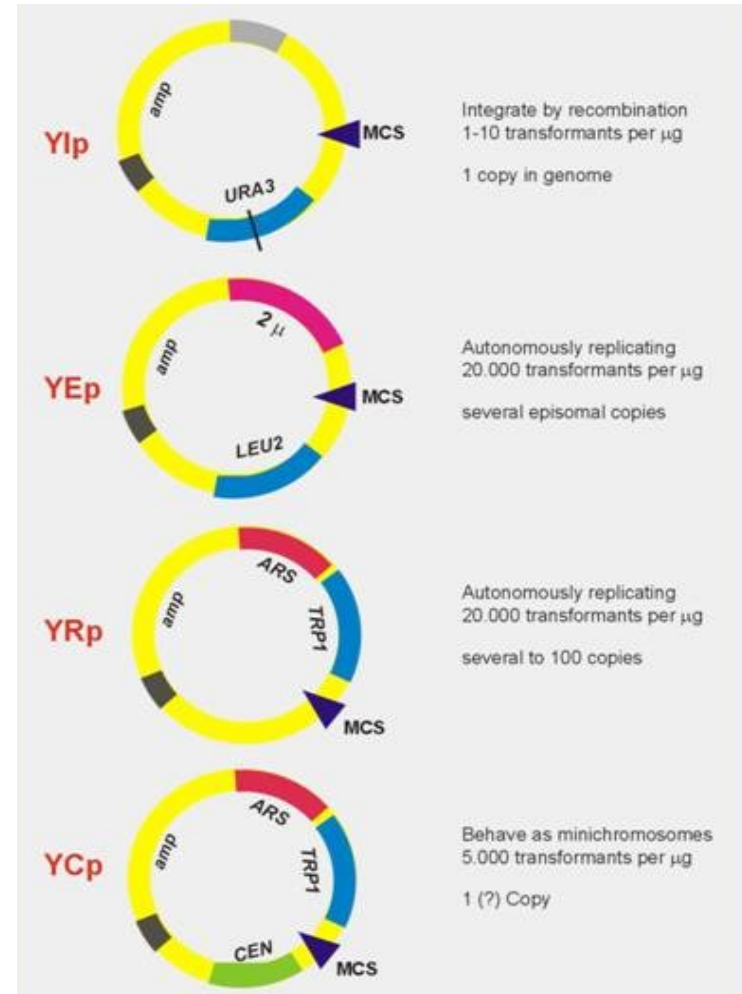
Alternativna klasifikacija vektorjev: YIp, YRp, YEp, YCp, YAC
(integracijski, replikacijski, episomski, centromerni plazmidi, umetni kromosomi):

- integracijski vektorji nimajo kvasovkinega *ori* – se vgrajujejo v genom; selekcijski markerji so Leu2, Ura2, His3 - deluje samo v sevih, ki imajo ustrezne mutacije;

- episomski: imajo *ori* plazmida 2 μ , 30-50/cel., lahko se izgubijo (a je prenos bolj zanesljiv kot pri YRp);

- replikacijski: imajo ARS (avtonomno podvajajoča se zaporedja), zato nastopajo samostojno, a se pri brstenju večkrat izgubijo;

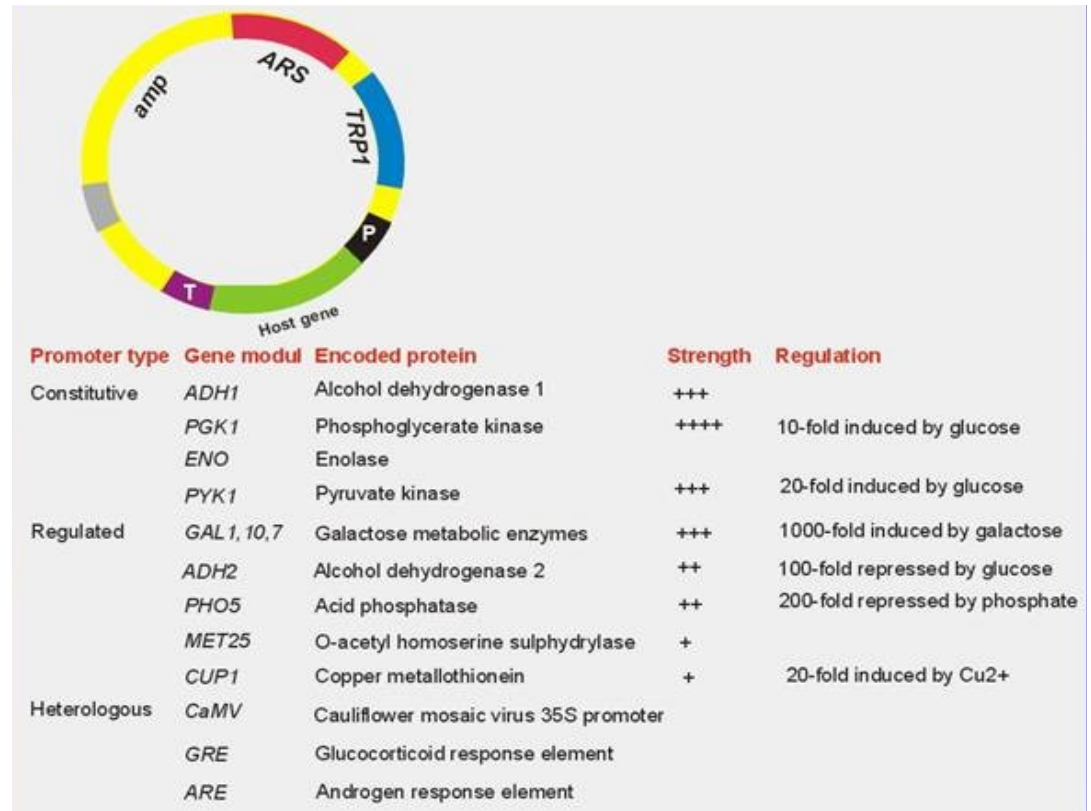
- centromerni: imajo kvasovkin centromer, zato so stabilni pri celični delitvi; malo kopij/cel.



Kvasovka *S. cerevisiae* /3

Optimizacija izražanja:

- povečanje števila kopij / celico
- terminatorji iz kvasovk
- raba kodona
- preprečevanje agregacije
- preprečevanje razgradnje s posredovanjem ubikvitina (N-končne fuzije s stabilnimi proteini kvasovk)
- izbor močnega promotorja:
 - ADH: alkohol dehidrogenaza
 - TDH: triozafosfat dehidrogenaza
 - GAL: razgradnja galaktoze
 - PHO5: kislina fosfataza
 - CUP-1: baker-vezavni protein



Kvasovka *S. cerevisiae* I4

Primer: Površinski antigen virusa hepatitisa B:

prvo registrirano rekombinantno cepivo (ZDA, 1986)

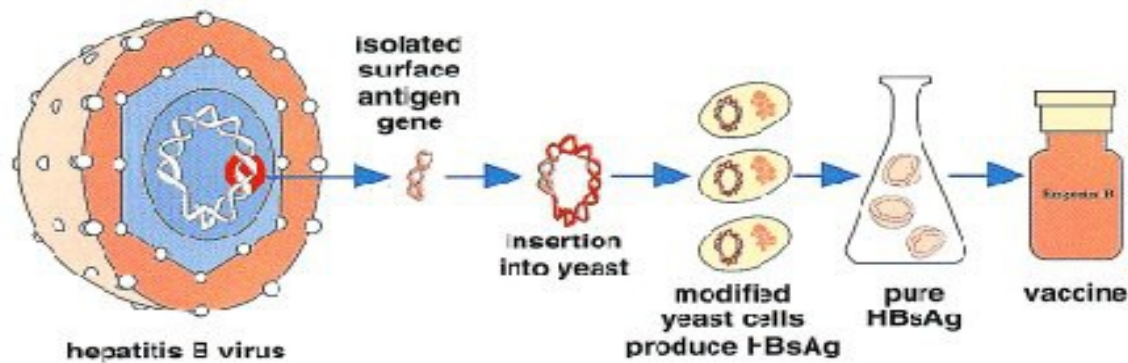
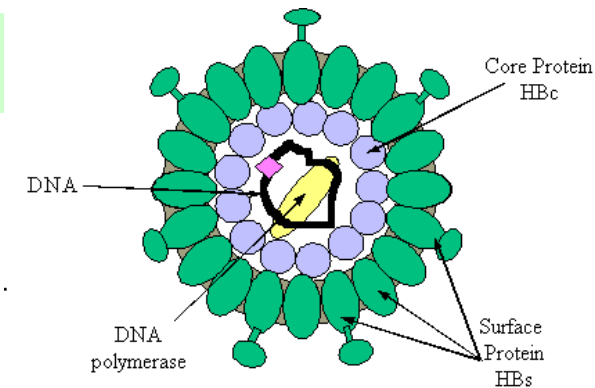
HBsAg: dober zaščitni antigen, 226 aa

Vnos zapisa v YEp, transformacija *S. cerevisiae*

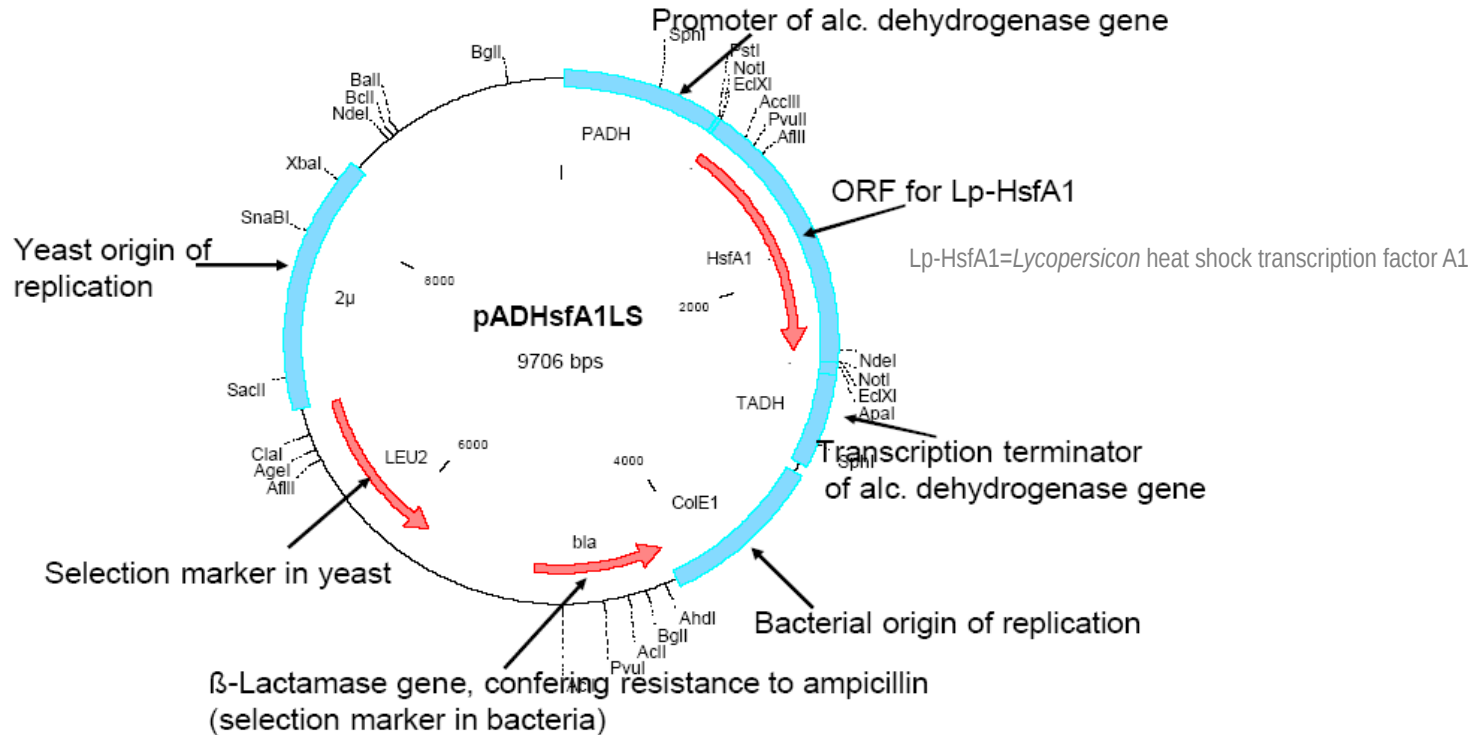
HBsAg pravilno zviti, se agregira v prazne virusne ovojnice ali delce (22 nm)

Optimizacija proizvodnje (Smith Kline-RIT): povečanje števila kopij plazmida na celico, zamenjava promotorja (ADH1 → TDH3)

Izpleni: pred optimizacijo: 0,06 % teže celic; izboljšanje gojišča: 0,4 %; zamenjava promotorja: 1 %; ostalo (tajni podatki): 6-7 %.



S. cerevisiae: vektorji



Kvasovke: selekcijski markerji

Selectable genetic markers used in yeast recombinant DNA technology

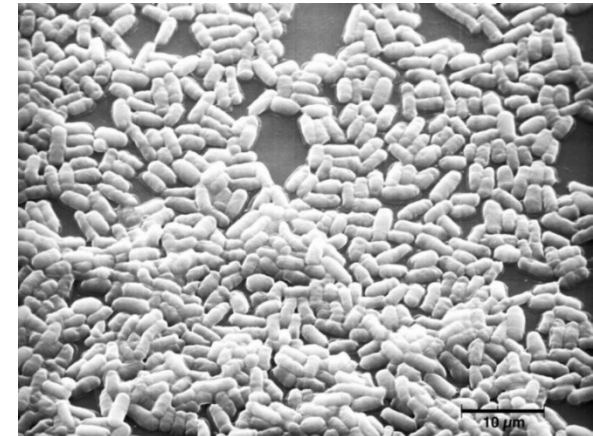
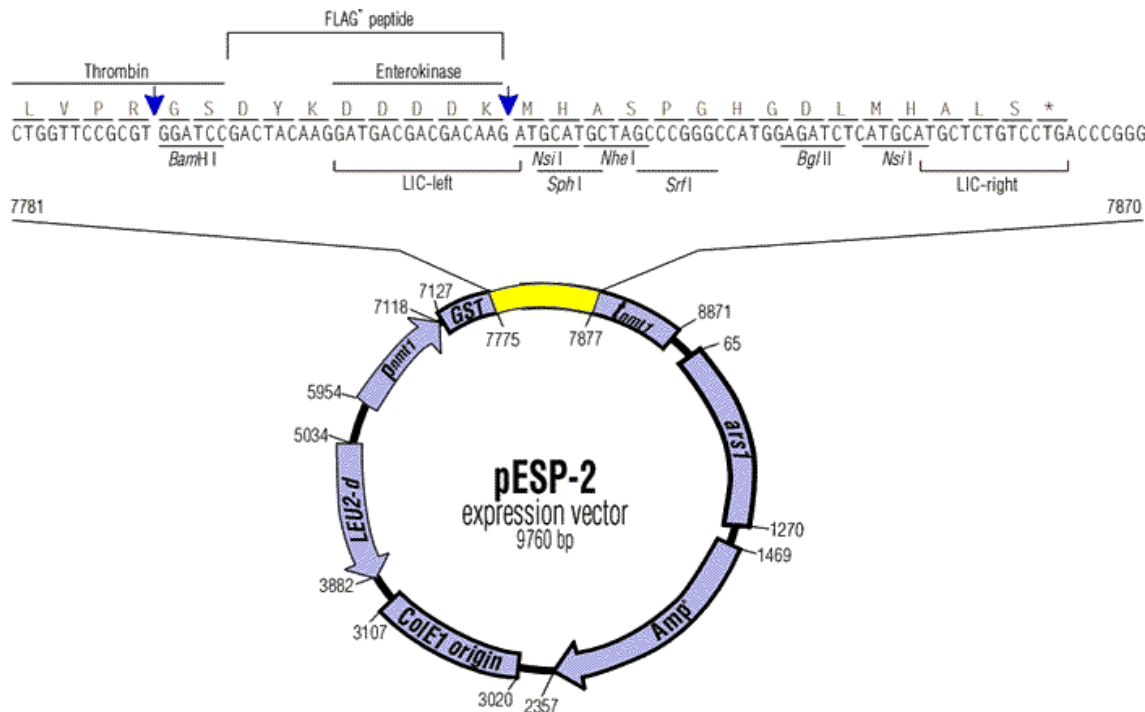
| Marker type | Gene | Comments |
|-------------|---|---|
| Recessive | <i>LEU2</i> | Genes complementing auxotrophic mutations for amino acid biosynthesis |
| | <i>TRP1</i> | |
| | <i>LYS2</i> | |
| | <i>HIS3</i> | |
| | <i>URA3</i> | Genes complementing autotrophy for nucleotides |
| | <i>ADE2</i> | |
| | <i>LacZ</i> | Enzyme activity (for screening rather than selection) |
| | <i>Amyloglucosidase</i> | |
| | <i>Luciferase</i> | |
| Dominant | <i>CUP1</i> | Copper resistance |
| | <i>G418^R</i> | Aminoglycoside resistance |
| | <i>TUN^R</i> | Tunicamycin resistance |
| | <i>KAN^R</i> | Kanamycin resistance |
| | <i>Hygromycin^R</i> | |
| | <i>Chloramphenicol^R</i> <i>Canavanine^R</i> | Genes conferring resistance to drugs |

leu2 - 2-izopropilmalat dehidrogenaza
trp1 – fosforibozilantranilat izomeraza
his3 - imidazolglicerol-P-dehidrataza
ura3 - orotidin-5'-fosfat dekarboksilaza

Druge kvasovke

Razen *S. cerevisiae* uporabljamo še več drugih vrst kvasovk, najpogosteje metilotrofno kvasovko *Pichia pastoris*.

Nekaj proteinov so pripravili tudi v *Schizosaccharomyces pombe*: ekspresijski vektorji so komercialno dostopni (Stratagene, Takara)



Več skupin razvija tudi ekspresijske sisteme za kvasovki *Kluyveromyces lactis* in *Yarrowia lipolytica*, vendar lahko pride do problemov zaradi nekompatibilnosti vektorjev in manj znane biologije gostiteljskih organizmov.

Metilotrofne kvasovke

lahko uporabljajo metanol kot edini vir ogljika

Rodovi: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*

Metabolizem razgradnje metanola vključuje več encimov, ki se intenzivno proizvajajo v prisotnosti induktorja (metanola) - imajo močne promotorje, ki so uporabni tudi za usmerjanje izražanja heterolognih genov.

Cereghino & Cregg, FEMS Microbiol. Rev. 2000

Komercialni sistemi uporabljajo samo vrste iz rodu *Pichia* in vrsto *Hansenula polymorpha*. Prednost kvasovke *H. polymorpha* je, da do indukcije pride tudi ob odsotnosti glicerola, ne samo ob dodatku metanola (pomembno pri velikih fermentacijah). Pri *H. polymorpha* gre za naključno nehomologno rekombinacijo - integracijo zapisa v genom, kar omogoča pripravo sevov z do 150 kopijami zapisa na genom (*P. pastoris*: homologna rekombinacija preko lokusov AOX ali *HIS4* ⇒ do 10 kopij). Vendar pa je promotor MOX (*H.p.*) šibkejši od promotorja AOX (*P.p.*).

H. p. raste v prisotnosti metanola hitreje kot *P.p.* z integriranim zapisom v lokusu AOX in je bolj termotolerantna od *P.p.*

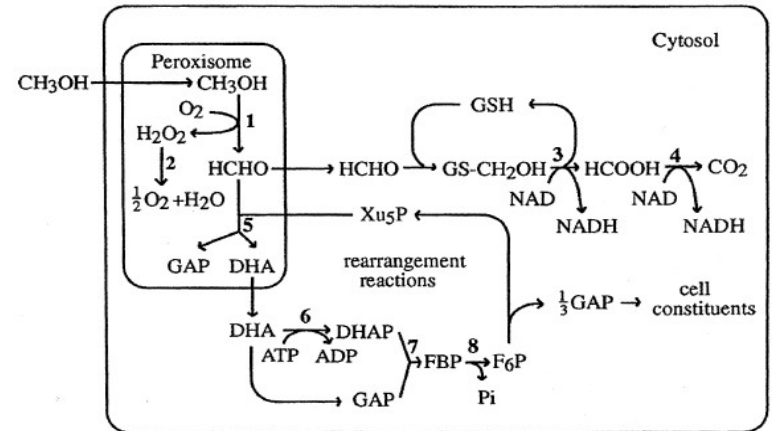


Fig. 2. The methanol pathway in *P. pastoris*. 1, alcohol oxidase; 2, catalase; 3, formaldehyde dehydrogenase; 4, formate dehydrogenase; 5, dihydroxyacetone synthase; 6, dihydroxyacetone kinase; 7, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; 8, fructose 1,6-bisphosphatase.

Pichia pastoris

Najpogosteje uporabljana metilotrofna kvasovka - sistemi patentirani (prevzel Invitrogen).

Selekcijski marker je običajno HIS4 (sevi z okvaro v *his*).

Vektorji so integracijski, vnos v celico večinoma z elektroporacijo.

Pred vnosom plazmid lineariziramo. Od restr. mest, ki jih za to izberemo, je odvisno, kam se bo vektor integriral: v lokus *his4* ali *aox* (vedno v regijo, ki je na koncih lineariziranega plazmida).

Celice proizvajajo v nekaterih primerih izredno visoke količine rekomb. proteinov (do 10 g/l kulture), v povprečju 10-100x več kot *S. cerevisiae*. Glikozilacija je bolj podobna tisti pri višjih evkariontih, saj verige sestavlja 8-14 manoznih ostankov (pri *S. cerevisiae* 50-150)

Pri razgradnji metanola z **alkohol oksidazo (AOX)** nastajata H₂O₂ in formaldehid (v peroksisomih).

Celice z v genóm vključenim zapisom za želeni protein najprej gojimo v glicerolnem gojišču, ko dosežemo optimalno gostoto celic, pa glicerol odvezemo in začnemo dodajati metanol. Pri wt sevih nastaja alkohol oksidaza, ki lahko doseže koncentracijo ~30 % vseh topnih proteinov v celici.

Pichia pastoris

Pri *P. pastoris* ločimo dva fenotipa, Mut⁺ in Mut^S.

Mut⁺: wt AOX, hitra rast na metanolnem gojišču

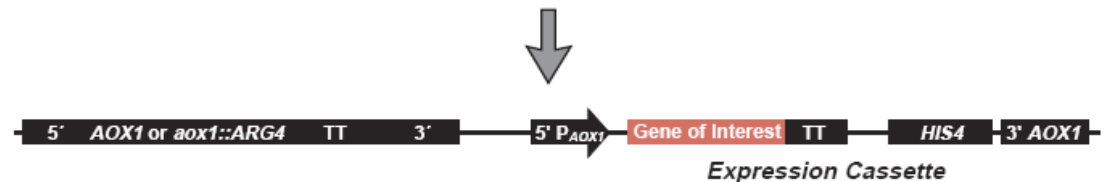
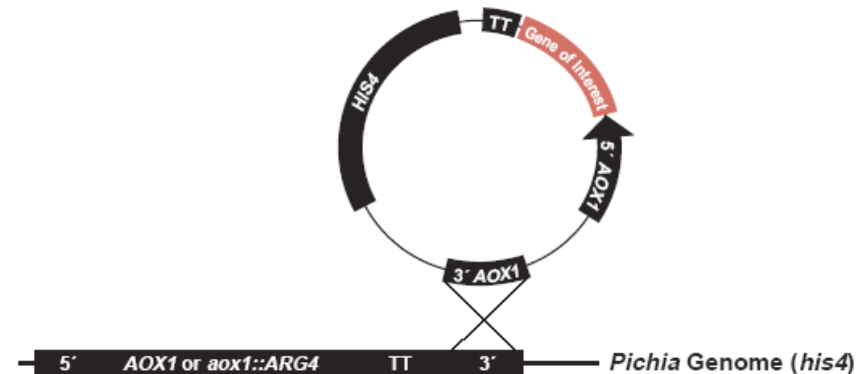
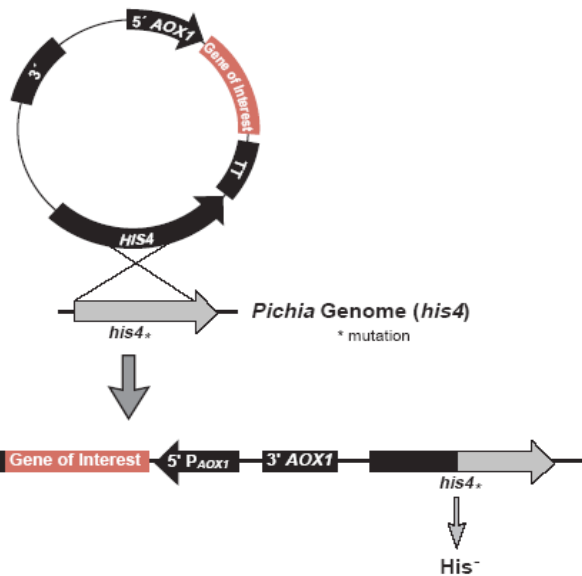
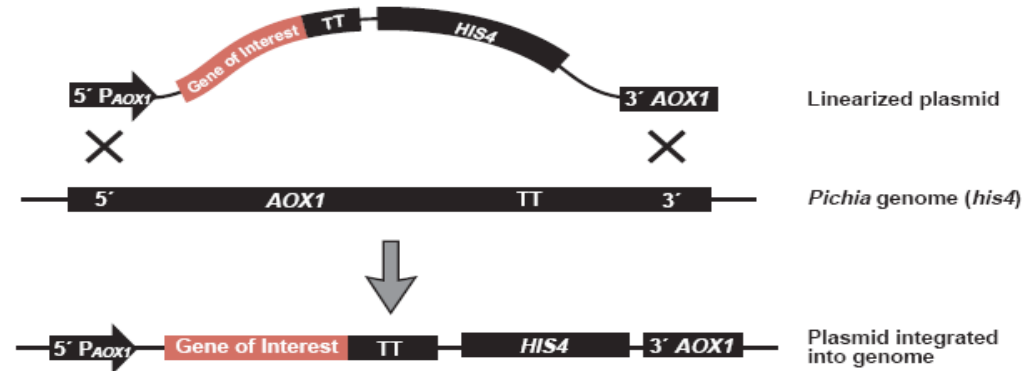
Mut^S: vnos inserta v regijo AOX, počasna rast na metanolnem gojišču zaradi AOX2

Celice Mut^S nastanejo, če pride do integracije v regijo AOX na tak način, da se gen za AOX izgubi (*integracija z zamenjavo*). Nekateri rekombinantni proteini se bolje proizvajajo v celicah, ki so Mut⁺, drugi v celicah Mut^S.

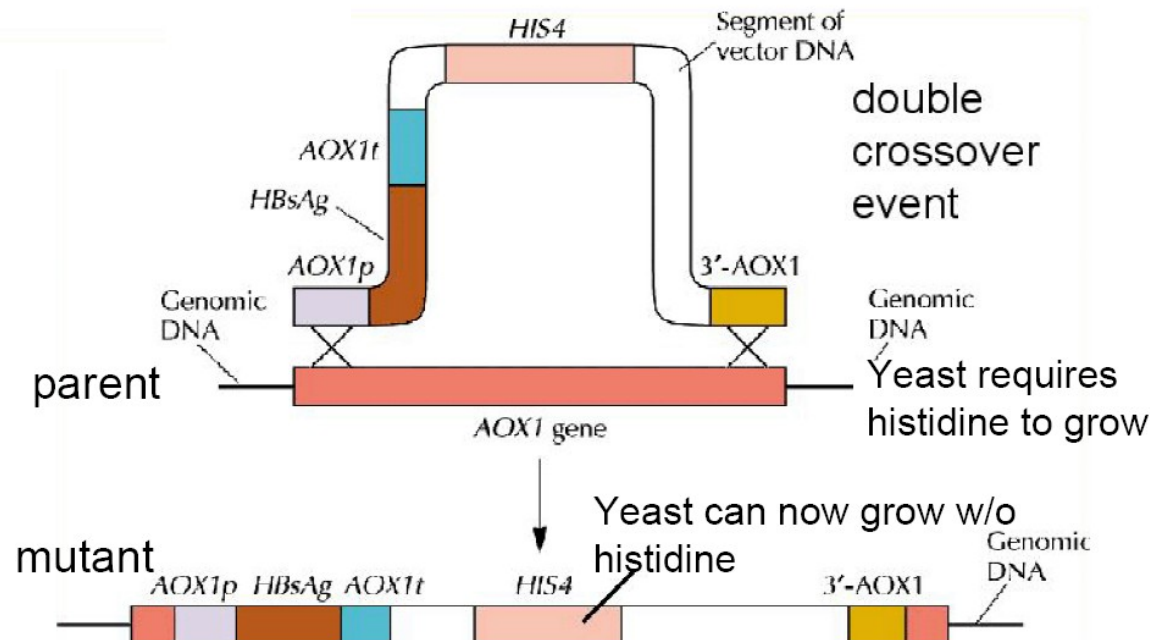
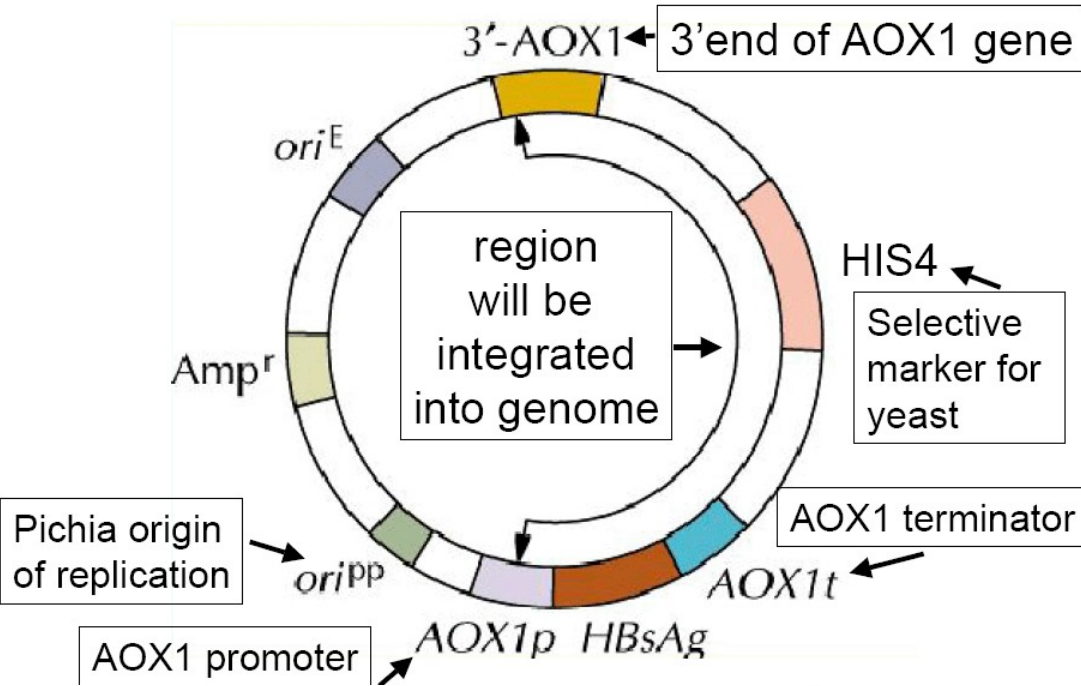
Glukoza je močan represor AOX, zato običajno v nobeni od stopenj gojenja ne uporabljamo gojišč z glukozo.

Pichia pastoris: integracija v genom

- Integracija z zamenjavo (\rightarrow MutS)
- Insercija v *his4*
- Insercija v *AOX1*



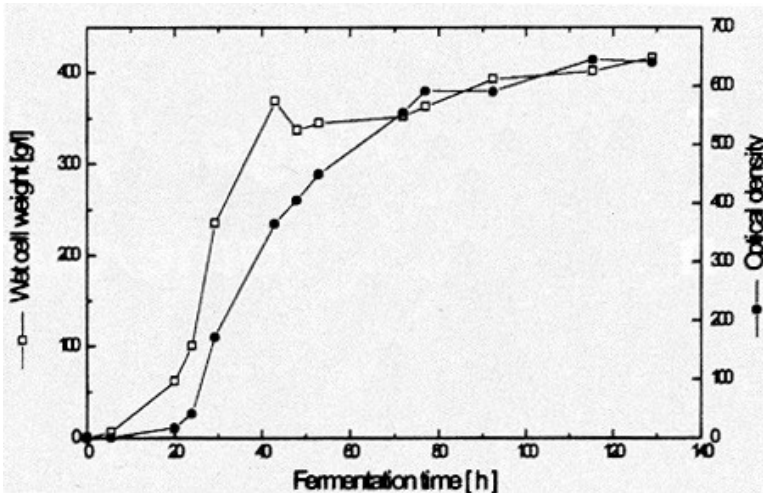
Pichia pastoris:
integracijski vektor



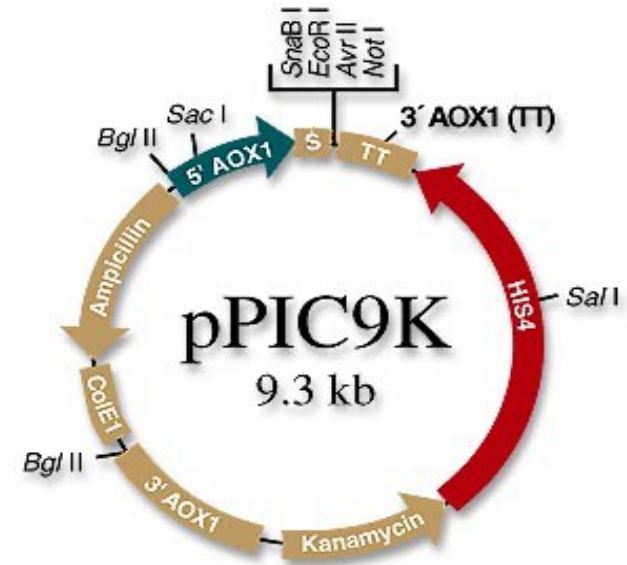
Pichia pastoris: vektorji /2

Pogosto uporabljan vektor pPIC9 (Invitrogen):
prenosljivi vektor (*ori* ColE1, Amp/KanR; His4);
AOX 5'/3', signalno zaporedje α MF (odcep s proteazo
KEX *in vivo*)

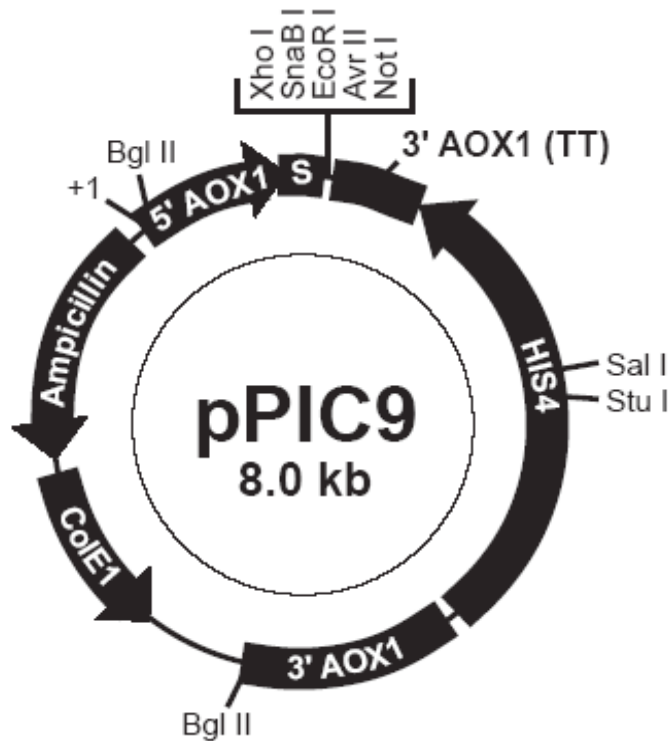
Alternativni vektorji (pPICZ): selekcija na
gojišču z zeocinom.



Rast v fermentorju: dosežemo visoke gostote, ki se lahko
odražajo v visoki proizvodnji.



Pichia pastoris: vektorji /3



773 AOX1 mRNA 5' end (824)
ACAGCAATAT ATAAACAGAA GGAAGCTGCC CTGTCTTAAA CCTTTTTTTT TATCATCATT ATTAGCTTAC

5' AOX1 Primer Site (855-875)
TTTCATAAATT GGGACTGGTT CCAATTGACA AGCTTTTGAT TTTAACGACT TTTAACGACA ACTTGAGAAG

α -Factor (949-1218)
ATCAAAAAAC AACTAATTAT TCGAAGGATC CAAAAG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala

GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT
Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp

GAA ACG GCA CAA ATT COG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp

TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA
Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile

α -Factor Primer Site (1152-1172) Xho I
AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA
Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg

Signal cleavage (1204) SnaB I EcoR I Avr II Not I
GAG GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA TTCGCCTTAG
Glu Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn ***

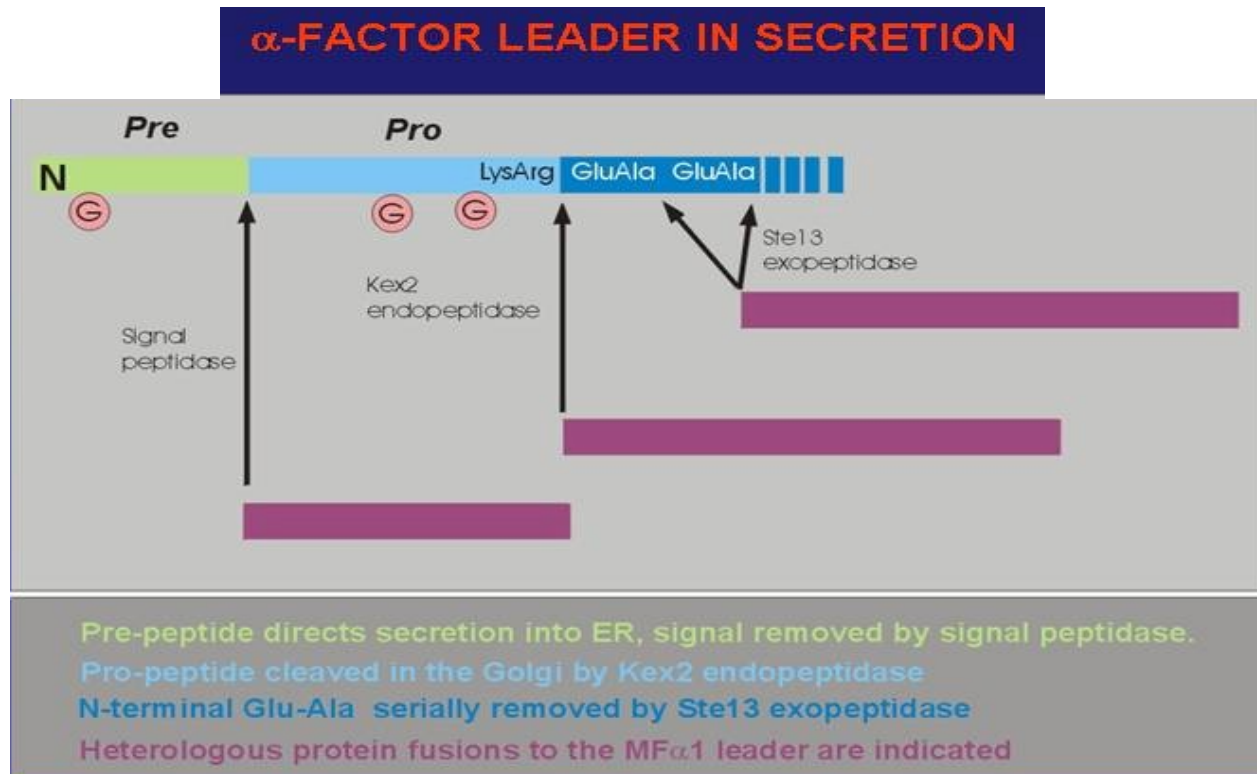
ACATGACTGT TCCTCAGTTC AAGTTGGGCA CTTACGAGAA GACCGTCTTT GCTAGATTCT AATCAAGAGG

3' AOX1 Primer Site (1327-1347)
ATGTCAGAAT GCCATTTGCC TGAGAGATGC AGGCCTTCATT TTGATACTT TTTTATTGT AACATATATA

AOX1 mRNA 3' end (1418)
GTATAGGATT TTTTTTGTC

Pichia pastoris: vektorji /4

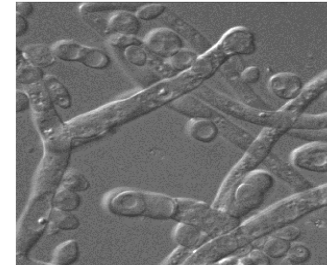
signalno zaporedje α MF - odcep s proteazo KEX *in vivo*



Nitaste glive

Uporabljajo jih predvsem za proizvodnjo lastnih metabolitov: penicilin, citronska kislina. Nekatere vrste pa so tudi gensko spremenili in uporabili za proizvodnjo heterolognih proteinov, npr. vrste *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *A. oryzae*, *Talaromyces emersonii*, *Penicillium sp.*

Gojimo jih lahko v posebnih fermentorjih na trdih gojiščih (predalne izvedbe) ali v tekočih gojiščih. Prednost: učinkovito izločanje proteinov iz celic.



Neurospora crassa: proizvedli so že več proteinov: mAb, proteaze, rastne faktorje; [Neugenesi] glukoamilazni promotor

Aspergillus: α -amilazni promotor

T. emersonii: endoglukanazni promotor

P. chrysogenum: promotor *phoA* (kislina fosfataza)

Primer: *A. nidulans*: proizvodnja aril-alkohol-oksிடaze iz glive *Pterotus*

promotor: alkohol-dehidrogenaza *A. nidulans*

seleksijski marker: *argB*, terminator: *trpC*

gojenje v stresalnih erlenmajericah

indukcija s treoninom; trajanje indukcije 48 h

čiščenje: gelska filtr. in IEC

