

## Molekulární biotechnologie č.8

- Produkce heterologního proteinu v eukaryontních buňkách

Eukaryontní buňky se využívají v případě, když

- Eukaryontní proteiny syntetizované v baktériích postrádají biologickou aktivitu
- Klonovaný lidský protein není identický s přirozeným proteinem (nemá stejné biochemické a funkční vlastnosti)

## Prokaryotické buňky

- Postrádají mechanismy zajišťující postranslační modifikace proteinů např.
- Tvorbu disulfidických vazeb,
- Proteolytické štěpení prekursorové formy
- Glykosylace (serin, threonin, asparagin)
- Modifikace AK uvnitř proteinu (fosforylace, sulfatace, acylace)

# Endotoxiny

- Komponenty bakteriálních stěn – lipopolysacharidy (endotoxiny) - jsou toxické (pyrogenní)
- Zůstávají v konečném produktu

## Byly vyvinuty

- Eukaryontní expresní systémy (vektory a k nim vhodné eukaryontní buňky)
- Zejména pro produkci proteinů, které jsou používány jako léčiva

## Základní rysy eukaryontního expresního vektoru (plasmidu)

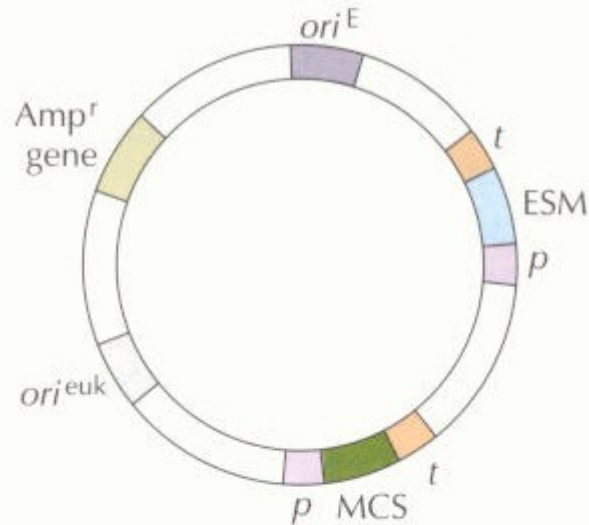
- Počátek replikace funkční v hostitelské buňce (bude-li vektor použit jako extrachromosomálně se replikující DNA) nebo
- chromosomální integrační místo nezbytné pro homologní rekombinaci (bude-li vektor použit pro integraci cizorodé DNA do hostitelské DNA)
- Eukaryotický markerový gen umožňující selekci v eukaryontní buňce
- Eukaryotickou promotorovou sekvenci
- Eukaryotické transkripční a translační stop signály
- Sekvence, které signalisují posttranslační modifikace mRNA

## Eukaryontní vektory jsou konstruovány

- Jako kyvadlové vektory (shuttle)
- To znamená, že mají počátek replikace a selekční marker funkční i v prokaryontní buňce (*E. coli*)
- Protože práce s rekombinantní DNA je technicky náročnější u eukaryotních buněk než u prokaryotních buněk

# Typický eukaryontní expresní vektor (Glick a spol.2003)

- Obr. 5.1.



*Figure 7.3* Generalized eukaryotic expression vector. The major features of a eukaryotic expression vector are a eukaryotic transcription unit with a promoter (*p*), a multiple cloning site (MCS) for a gene of interest, and a DNA segment with termination and polyadenylation signals (*t*); a eukaryotic selectable marker (ESM) gene system; an origin of replication that functions in the eukaryotic cell (*ori<sup>euk</sup>*); an origin of replication that functions in *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*); and an *E. coli* selectable marker gene (*Amp<sup>r</sup>*).



## Kyvadlové expresní vektory byly vyvinuty

- Pro buňky kvasinek
- Hmyzí buňky
- Savčí buňky
- A to zejména z důvodu postranslačních modifikací potenciálního heterologního proteinu
- U jednotlivých proteinů je třeba testovat různé eukaryontní expresní systémy s cílem najít ten, který dává biologicky autentický produkt

## Expresní systémy *Saccharomyces cerevisiae*

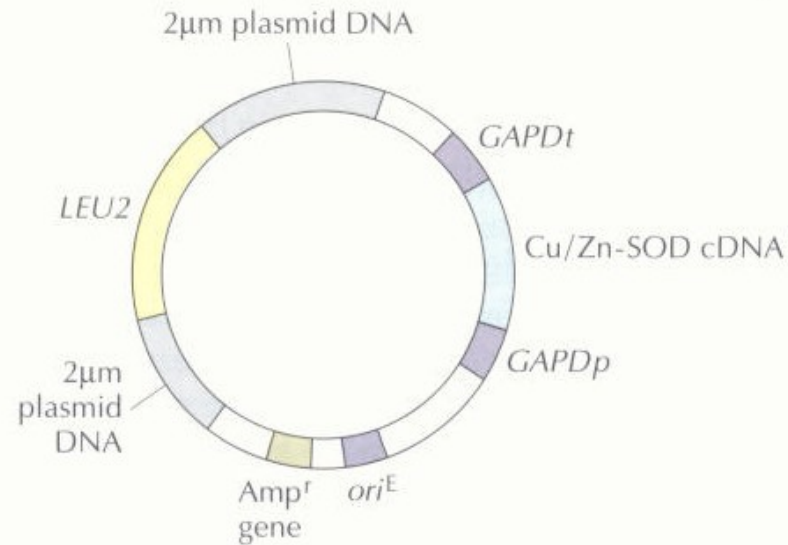
- Tato kvasinka je používána pro klonování eukaryontních genů

## Výhodné vlastnosti *Saccharomyces cerevisiae*

- Jednobuněčný organismus, dobře prostudovaný
- Snadno se kultivuje v malých objemech i ve velkých bioreaktorech
- Provádí mnoho postranslačních modifikací proteinů
- Sekretuje do prostředí málo proteinů, což usnadňuje purifikaci rekombinantního proteinu
- Je považována ze zcela bezpečný organismus (GRAS: generally recognised as safe) - staletí se používá v potravinářství
- Bylo izolováno a charakterizováno několik silných promotorů a plasmid 2  $\mu$ m, využitelný jako vektor

# Expresní vektor *S. cerevisiae* (Glick a spol.2003)

*Figure 7.7* *S. cerevisiae* expression vector. The cDNA for human Cu/Zn-SOD was cloned between the promoter (*GAPDp*) and termination-polyadenylation sequence (*GAPDt*) of the *S. cerevisiae* glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene. The *LEU2* gene that was cloned between segments of the yeast 2 $\mu$ m plasmid DNA encodes a functional enzyme of the leucine biosynthesis pathway. The yeast origin of replication is included in the 2 $\mu$ m plasmid DNA. The ampicillin resistance gene (*Amp<sup>r</sup>*) and the *E. coli* origin of replication (*ori<sup>E</sup>*) are derived from plasmid pBR322.



# Promotory využívané v expresních vektorech (Glick a spol.2003)

Table 7.1 Promoters for *S. cerevisiae* expression vectors

Promoter	Expression conditions	Status
Acid phosphatase ( <i>PH05</i> )	Phosphate-deficient medium	Inducible
Alcohol dehydrogenase I ( <i>ADHI</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
Alcohol dehydrogenase II ( <i>ADHII</i> )	0.1–0.2% Glucose	Inducible
Cytochrome <i>c</i> <sub>1</sub> ( <i>CYC1</i> )	Glucose	Repressible
Gal-1-P Glc-1-P uridyltransferase	Galactose	Inducible
Galactokinase ( <i>GAL1</i> )	Galactose	Inducible
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>GAPD</i> , <i>GAPDH</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
Metallothionein ( <i>CUP1</i> )	0.03–0.1 mM copper	Inducible
Phosphoglycerate kinase ( <i>PGK</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
Triose phosphate isomerase ( <i>TPI</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
UDP galactose epimerase ( <i>GAL10</i> )	Galactose	Inducible

# Rekombinantní proteiny produkované *S. cerevisiae* (Glick a spol.)

## VACCINES

- Hepatitis B virus surface antigen
- Malaria circumsporozoite protein
- HIV-1 envelope protein

## DIAGNOSTICS

- Hepatitis C virus protein
- HIV-1 antigens

## HUMAN THERAPEUTIC AGENTS

- Epidermal growth factor
- Insulin
- Insulin-like growth factor
- Platelet-derived growth factor
- Proinsulin
- Fibroblast growth factor
- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- $\alpha_1$  antitrypsin
- Blood coagulation factor XIIIa
- Hirudin
- Human growth factor
- Human serum albumin

*Figure 7.4* Recombinant proteins produced by *S. cerevisiae* expression systems. HIV-1, human immunodeficiency virus type 1.

## Expresní vektory *S. cerevisiae*

- Plasmidové vektory (episomální) (pro produkci intra- a extracelulárních heterologních proteinů, při kultivaci buněk ve velkém objemu asi 10 l nestabilní)
- Integrační vektory (stabilnější)

# YAC vektory

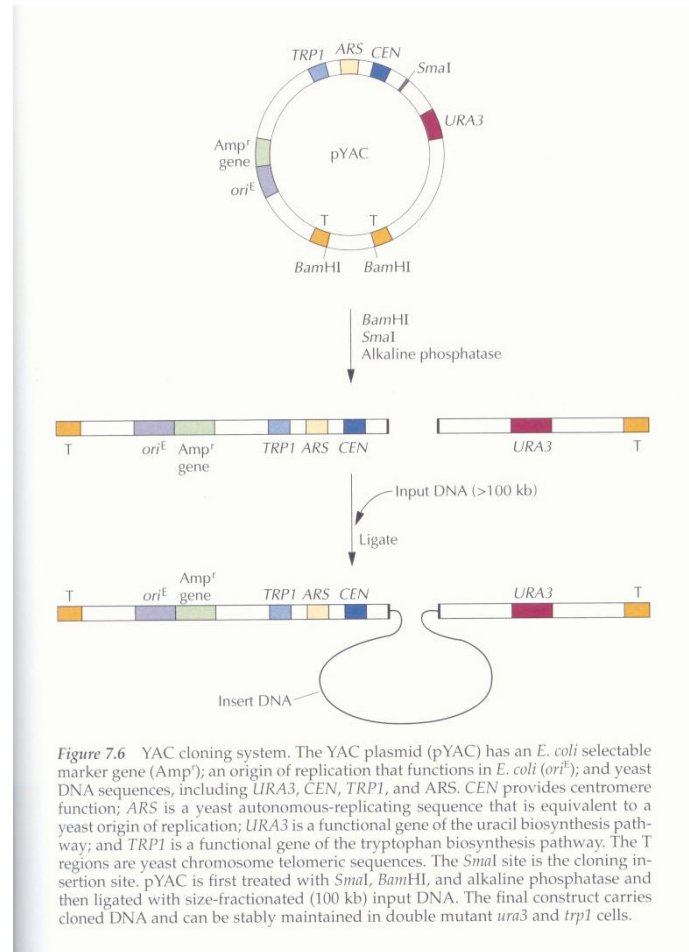
- Kvasinkové artificiální chromosomy (YAC, yeast arteficial chromosomes)
- pro klonování dlouhých úseků DNA (100 kb)



# Program Heureka

- YAC vektory byly použity pro fyzikální mapování lidského genomu a konstrukci lidské genové knihovny
- V kvasinkové buňce udržovány jako zvláštní chromosom

# YAC - Kvasinkový umělý chromosom



## YAC vektor

- Má sekvence fungující jako počátek replikace v kvasince i v bakteriální buňce
- V bakteriální buňce se replikuje jako plasmid (ori sekvence), selekce buněk nesoucích vektor umožňuje gen pro rezistenci na ampicilin
- ARS sekvence pro autonomní replikaci v kvasince
- CEN funguje jako centromera
- Po linearizaci má na obou koncích sekvence, které působí jako telomery a zabezpečují stabilitu vektoru v kvasince
- URA3 ... gen pro biosyntézu uracilu
- TRP1.... gen pro biosyntézu tryptofanu
- *Sma*I... klonovací místo

## Použití YAC jako klonovacího vektoru

- Naštěpí se *Sma*I a *Bam*HI
- Působí se alkalickou fosfatázou
- Pro ligaci se použijí fragmenty větší než 100 kb
- Konstrukt s klonovanou DNA se stabilně udrží v hostitelské kvasince defektní v biosyntéze uracilu a tryptofanu (mutace *ura* a *trp*)
- (hostitelské buňky na mediu bez přídavku uracilu a tryptofanu nerostou)

## Expese rekombinantních proteinů v *S. cerevisiae*

- Byla u mnoha proteinů úspěšná
- Expese však bývala nízká (i v případě použití regulovatelných promotorů)
- Problém býval se stabilitou insertu
- Heterologní protein býval často hyperglykosylován (místo 8-13 manosových zbytků obsahoval 100 zbytků, což mělo vliv na aktivitu proteinu a jeho imunogenicitu)
- Proteiny často nebyly sekretovány do prostředí, což mělo negativní vliv na purifikaci

## Byly vyvinuty další kvasinkové expresní systémy

- *Kluyveromyces lactis* (komerčně používána pro produkci beta-galaktosidázy)
- *Schizosacharomyces pombe*
- *Yarrowia lipolytica* (využívá jako substrát uhlovodíky)
- *Pichia pastoris* (utilizuje metanol jako jediný zdroj uhlíku)
- *Hansenula polymorpha*



## Expresní systémy s využitím hmyzích buněk

- Jako vektory využívají hmyzí virusy - bakulovirusy
- Hmyzí buňky kultivované *in vitro*

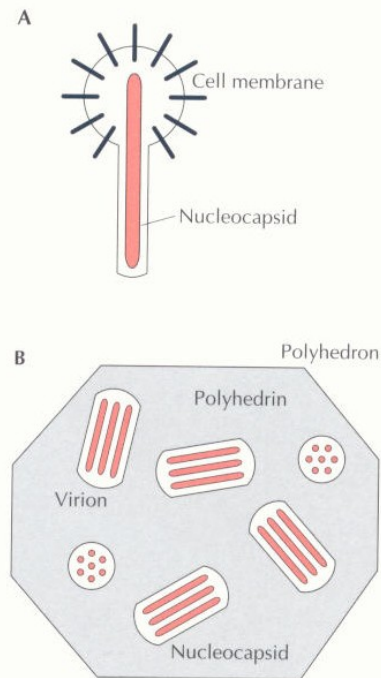


V průběhu životního cyklu vznikají dvě formy bakulovirusů:

- Jednotlivé infekční viriony
- Viriony v ochranné proteinové matrix (polyhedrin)
- Polyhedrin je syntetizován ve velkých množstvích, protože promotor genu pro polyhedrin je velmi silný
- Tento promotor byl využit pro syntézu heterologního proteinu, ke které dochází v hmyzích buňkách kultivovaných *in vitro*

# Dvě formy bakulovirusů

*Figure 7.10* Budded (A) and occluded (B) forms of *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. During budding, a nucleocapsid becomes enveloped by the membrane of an infected cell. A polyhedron consists of clusters of nucleocapsids (occluded virions) embedded with various orientations in a polyhedrin matrix.



## Bakulovirusy jsou používány

- Jako expresní vektory pro savčí proteiny
- Výhodou je, že postranlační modifikace proteinů jsou u hmyzu a u savců téměř shodné
- Obzvláště se používá virus *AcMNPV* (*Autographa californica multiple polyhedrosis virus*) (polyedrie – choroba housenek)
- Roste v mnoha hmyzích buněčných liniích

# U bakulovirusů

- Se využívají tzv. bakulovirové transferové vektory
- Prvním krokem při konstrukci rekombinantního bakulovirusu je vytvoření transferového vektoru

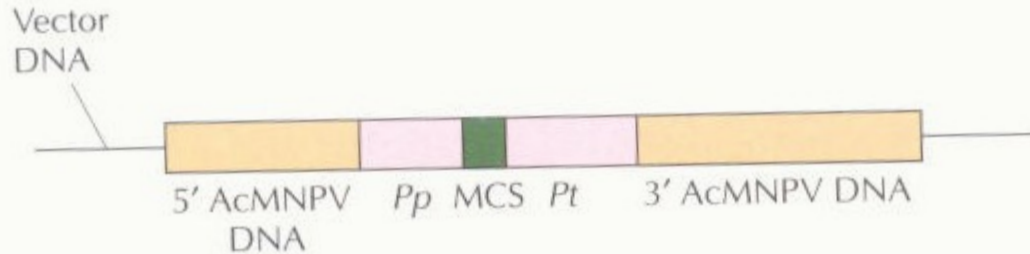
## Bakulovirový transferový vektor

- se skládá z části DNA virusu AcMNPV, z části DNA plasmidu *E. coli* a z expresní jednotky, která obsahuje cizorodý gen

## Dalším krokem je

- nahrazení polyhedrinového genu expresní jednotkou (homologní rekombinace)

# Expresní bakulovirová jednotka (Glick a spol.2003)



**Figure 7.11** Organization of the expression unit of a baculovirus (AcMNPV) transfer vector. The gene of interest is inserted into the multiple cloning site (MCS) that lies between the polyhedrin gene promoter (*Pp*) and polyhedrin gene transcription termination (*Pt*) sequences. The AcMNPV DNA upstream from the polyhedrin promoter (5' AcMNPV DNA) and downstream from the polyhedrin transcription termination sequence (3' AcMNPV DNA) provides sequences for integration of the expression unit by homologous recombination into a AcMNPV genome.

# Důležité segmenty DNA transferového vektoru

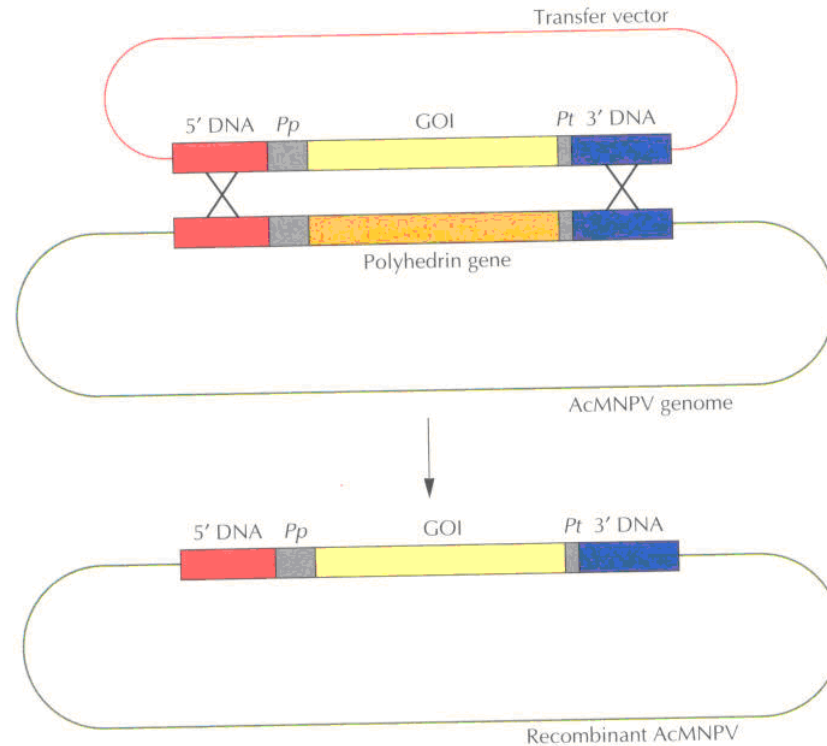
- Část DNA sekvence viru AcMNPV, která slouží jako oblast pro homologní rekombinaci
- Polyhedrinový promotor
- Oblast nesoucí polyhedrinové signály pro terminaci transkripce a polyadenylaci
- Další oblast homologie viru AcMNPV pro homologní rekombinaci
- Klonovací místo pro vložení cizorodé DNA
- Kódující oblast polyhedrinového genu je deletována
- Místo ní se mezi polyhedrinový promotor a terminátor vkládá klonovaná DNA.
- Konstrukt je množen v *E. coli*



## Přenos cizorodého genu do hostitelských hmyzích buněk

- Rekombinantní DNA nesoucí klonovaný gen je transformována spolu s DNA intaktního virusu AcMNPV do hostitelských hmyzích buněk
- V některých buňkách dojde k dvojitému c-o a k integraci klonovaného genu s promotorem a terminátorem do AcMNPV DNA (se současnou ztrátou polyhedrinového genu)

# Infekční rekombinantní AcMNPV vzniklý homologní rekombinací



*Figure 7.12* Replacement of the AcMNPV polyhedrin gene with an expression unit from a transfer vector. A double crossover event (X) between homologous DNA segments of the transfer vector and the AcMNPV genome results in the integration of the expression unit into the AcMNPV genome. GOI, gene of interest; *Pp*, polyhedrin promoter; *Pt*, polyhedrin polyadenylation and termination sequence.

## Izolace rekombinantního bakulovirusu

- Viriony bez polyhedrinového genu s klonovaným genem vytvářejí na hmyzích buňkách zóny buněčné lyze, z nichž se izoluje rekombinantní bakulovirus
- Pro identifikaci rekombinantních bakulovirusů lze použít DNA/DNA hybridizaci
- Rekombinantní bakulovirus se použije pro infekci hmyzích buněk

# Syntéza rekombinantního proteinu

- 4 až 5 dní po infekci hostitelských buněk rekombinantním bakulovirusem
- Jako hostitelské buňky se používá buněčná linie odvozená od *Spodoptera frugiperda* (můra, asi Blýskavka, čeleď můrovitých, u nás nežije), v nichž je polyhedrinový promotor obzvlášť aktivní

## S využitím bakulovirových expresních systémů

- Bylo nasyntetizováno velké množství heterologních proteinů s přesnými postranslačními modifikacemi.

# Příklady heterologních proteinů syntetizovaných v hmyzích buňkách (Glick a spol.2003)

- Obr.

*Figure 7.13* Some of the recombinant proteins that have been produced by the baculovirus expression vector system. HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HSV, herpes simplex virus.

$\alpha$ -Interferon	G-protein-coupled receptors	Malaria proteins
Adenosine deaminase	HIV-1 envelope protein	Mouse monoclonal antibodies
Anthrax antigen	HSV capsid proteins	Multidrug transporter protein
$\beta$ -Amyloid precursor protein	Human alkaline phosphatase	Poliovirus proteins
$\beta$ -Interferon	Human DNA polymerase $\alpha$	Pseudorabies virus glycoprotein 50
Bovine rhodopsin	Human pancreatic lipase	Rabies virus glycoprotein
Bluetongue virus neutralization antigen	Influenza virus hemagglutinin	Respiratory syncytial virus antigen
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	Interleukin-2	Simian rotavirus capsid antigen
Dengue virus type 1 antigen	Lassa virus protein	Tissue plasminogen activator
Erythropoietin		

## Využití housenek

- Rekombinantním bakulovirusem lze infikovat přímo housenky
- Housenky pak slouží jako levné továrny pro výrobu proteinů
- Bylo testováno s využitím housenek *Trichoplusia mi* (můra kovolessklec), které byly infikovány rekombinantním AcMNPV s lidským genem pro adenosin deaminázu

Za 4 dny tvořila lidská deamináza asi 5% celkového hmyzího proteinu. Z 22 housenek bylo získáno 9 mg homogenního proteinu (levné a nenáročné). Udržování housenek vyžadovalo 3 hod. práce týdně (práce s hmyzími tkáňovými kulturami je časově náročná a drahá).

# Kontinuální syntéza rekombinantního proteinu

- Bakulovirusový expresní systém je krátkodobý
- K lyzi buněk (nebo úhynu housenek) dochází 4-5 dní po infekci
- Pro komerční výrobu je výhodná kontinuální syntéza rekombinantního proteinu (umožňuje kontrolu a optimalizaci systému)



## Kontinuální systém lze vytvořit

- Použitím 2 bioreaktorů
- V jednom jsou buňky kultivovány a po nakultivování jsou přemístěny do druhého bioreaktoru
- V druhém reaktoru jsou buňky infikovány rekombinantním bakulovirusem a po 5 dnech je získán produkt (rekombinantní protein)

## Expresní systémy s využitím savčích buněk

- Savčí expresní systémy byly původně konstruovány pro studium funkce genů a jejich regulací.
- Vektory byly odvozeny z DNA živočišných virů (virus SV40, polyomavirus, herpes virus, bovinní papilomavirus).
- Exprese cizorodého proteinu bývala přechodná, výtěžky nízké a klonovací postupy obtížné.

## Určité lidské terapeutické proteiny

- Mohou být syntetizovány a posttranslačně modifikovány pouze savčími buňkami.
- Proto byly konstruovány kyvadlové vektory, které umožňují expresi cizorodého proteinu v savčích buňkách

## Použití kyvadlového vektoru

- Klonovací kroky se provádějí v buňkách *E. coli*,
- v nichž lze snadno získat velké množství plasmidu
- K produkci heterologního proteinu dochází v lidských buňkách kultivovaných ve tkáňové kultuře

## Kyvadlový vektor odvozený z lidského papova virusu BKV

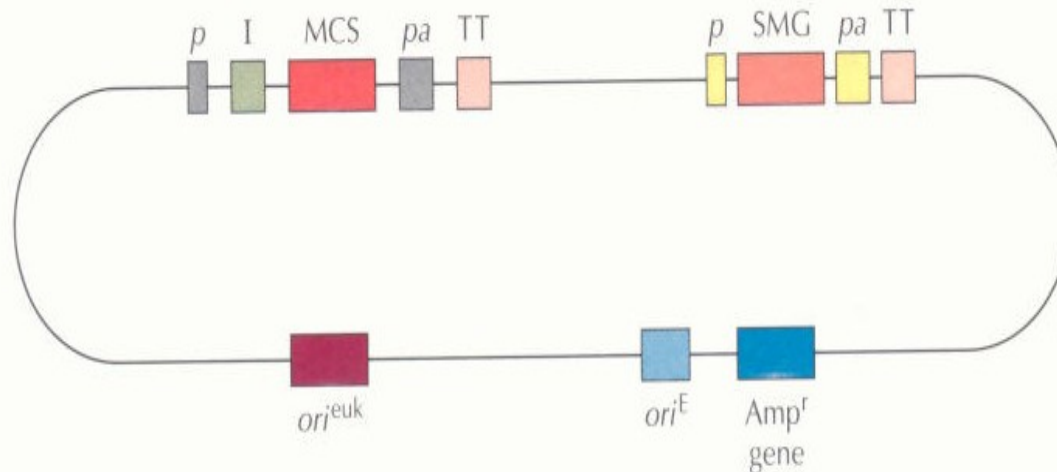
- Lze udržovat po mnoho generací v kultivovaných lidských buňkách jako extrachromosomální element s vysokým počtem kopií
- Vektor neobsahuje geny, které kódují virové proteiny
- V *E. coli* se může udržet jako plasmid

## Složený BKV kyvadlový vektor mj. obsahuje

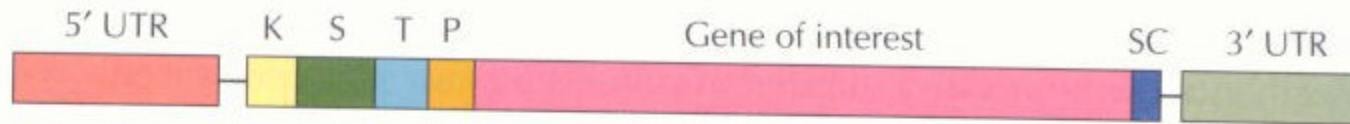
- Promotor genu pro neomycin rezistenci z SV40 virusu (produkt tohoto genu inaktivuje antibiotikum G418)
- Promotor genu tumoru myší mléčné žlázy (MMTP), který je regulován
- sekvencí DRE (enhancerová sekvence), která zvyšuje transkripci genu – je odvozena z genu pro cytochrom P450)

# Savčí expresní vektor – obecně jako kyvadlový vektor (Glick a spol.2003)

*Figure 7.16* Generalized mammalian expression vector. The multiple cloning site (MCS) and selectable marker gene (SMG) are under the control of eukaryotic promoter ( $p$ ), polyadenylation ( $pa$ ), and termination of transcription (TT) sequences. An intron (I) enhances the production of heterologous protein. Propagation of the vector in *E. coli* and mammalian cells depends on the origins of replication  $ori^E$  and  $ori^{euk}$ , respectively. The ampicillin gene ( $Amp^r$ ) is used for selecting transformed *E. coli*.



# Využití translačních kontrolních elementů (Glick 2003)



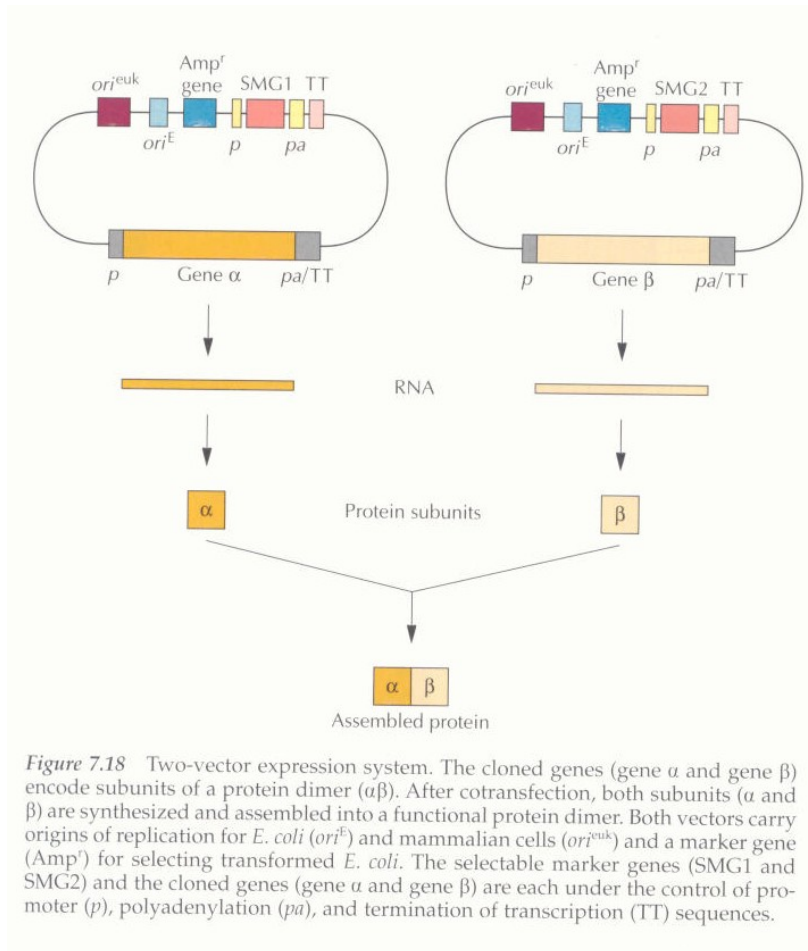
*Figure 7.17* Translation control elements. A gene of interest can be fitted with various sequences that enhance translation and facilitate both secretion and purification, such as a Kozak sequence (K), signal sequence (S), protein affinity tag (T), proteolytic cleavage site (P), and stop codon (SC). The 5' and 3' UTRs (untranslated regions) increase the efficiency of translation and contribute to mRNA stability.



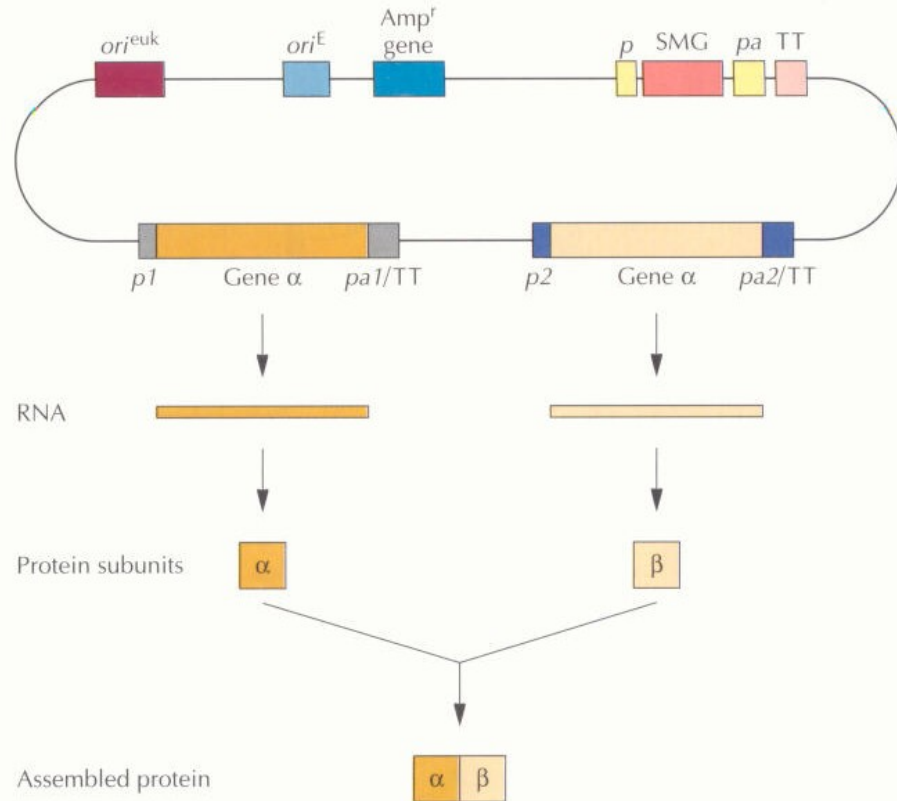
## Byly zkonstruovány

- Dvouvektorové expresní systémy (2 subjednotky proteinu, každá na jiném vektoru)
- Vektory pro expresi dvou genů (2 subjednotky proteinu v 1 vektoru)

# Dvouvektorové expresní systémy



# Vektor pro expresi dvou genu



**Figure 7.19** Two-gene expression vector. The cloned genes (gene  $\alpha$  and gene  $\beta$ ) encode subunits of a protein dimer ( $\alpha\beta$ ). The cloned genes are inserted into a vector and are under the control of different eukaryotic promoter (*p*), polyadenylation (*pa*), and termination of transcription sequences (*TT*). Each subunit is translated from a separate mRNA, and a functional protein dimer ( $\alpha\beta$ ) is assembled. The vector has origins of replication for *E. coli* (*ori<sup>E</sup>*) and mammalian cells (*ori<sup>euk</sup>*), a marker gene (*Amp<sup>r</sup>*) for selecting transformed *E. coli*, and a selectable marker gene (*SMG*) that is under the control of eukaryotic promoter (*p*), polyadenylation (*pa*), and termination of transcription (*TT*) sequences.

# Selekční markery používané na vektorech u savčích buněk

Table 7.2 Selective marker gene systems for mammalian cells

Selective agent	Action of selective agent	Marker gene	Action of marker gene protein
Xyl-A	Damages DNA	Adenine deaminase ( <i>ada</i> )	Deaminates Xyl-A
Blasticidin S	Inhibits protein synthesis	Blasticidin S deaminases ( <i>Bsr</i> , <i>BSD</i> )	Deaminates blasticidin S
Bleomycin	Breaks DNA strands	Bleomycin-binding protein ( <i>Ble</i> )	Binds to bleomycin
G-418 (Geneticin)	Inhibits protein synthesis	Neomycin phosphotransferase ( <i>Neo</i> )	Phosphorylates G-418
Histidinol	Produces cytotoxic effects	Histidinol dehydrogenase ( <i>hisD</i> )	Oxidizes histidinol to histidine
Hygromycin B	Inhibits protein synthesis	Hygromycin B phosphotransferase ( <i>Hph</i> )	Phosphorylates hygromycin B
MSX	Inhibits glutamine synthesis	Glutamine synthetase ( <i>GS</i> )	Cells that produce excess glutamine synthetase survive
MTX	Inhibits DNA synthesis	Dihydrofolate reductase ( <i>dhfr</i> )	Cells that produce excess dihydrofolate reductase survive
PALA	Inhibits purine synthesis	Cytosine deaminase ( <i>codA</i> )	Lowers cytosine levels in the medium by converting cytosine to uracil
Puromycin	Inhibits protein synthesis	Puromycin <i>N</i> -acetyltransferase ( <i>Pac</i> )	Acetylates puromycin

MSX, methionine sulfoximine; MTX, methotrexate; PALA, *N*-(phosphoacetyl)-L-aspartate; Xyl-A, 9- $\beta$ -D-xylofuranosyl adenine.

## Produkce proteinových léčiv pro klinické zkoušky

- Zájem o stabilní, účinné expresní systémy pro produkci humánních proteinů stále stoupá.
- V současnosti je testováno přes 300 proteinů připravených ve velkém s využitím savčích a lidských tkáňových kultur.
- Předpokládá se, že moderní přístupy sníží náklady na produkci důležitých proteinových léčiv a učiní je mnohem přístupnější širokým vrstvám pacientů.