

Rekombináns fehérjék előállítására szolgáló expressziós rendszerek

Takács István Márton¹, Rokonay Réka dr.¹, Lippai Rita dr.¹, Sziksz Erna dr.^{1,2}, Szabó J. Attila dr.^{1,2}, Vannay Ádám dr.^{1,2}

¹ Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest (Igazgató: Szabó Attila dr.)

² MTA-SE, Gyermekgyógyászati és Nephrológiai Kutatócsoport, Budapest (Vezető: Tulassay Tivadar dr.)

LEVELEZÉSI CÍM:

Vannay Ádám dr.

1083 Budapest, Bókay János utca 53–54.

E-posta: vannay.adam@med.semmelweis-univ.hu

ÖSSZEFOGLALÁS A fehérje természetű biológiai hatóanyagok rendkívül széles körű felhasználhatósága miatt napjainkban a biotechnológiai módszerekkel előállított rekombináns proteinek iránti igény egyre növekszik. Összefoglaló közleményünk célja a jelenleg leggyakrabban alkalmazott, valamint a jövőben alternatívát nyújtó fehérje expressziós rendszerek rövid áttekintése.

KULCSSZAVAK rekombináns fehérje, expressziós rendszerek

A biotechnológia utóbbi évtizedekben bekövetkezett ugrásszerű fejlődésének köszönhetően számos peptid, illetve fehérje természetű biológiai hatóanyag került bevezetésre a mindennapi orvosi gyakorlatba. Széles körben alkalmazzák a különböző inzulin készítményeket, hormonokat (parathormon, szomatropin), növekedési faktorokat (kolónia stimuláló faktorok), vakcinákat (veszettség, hepatitis-B), valamint a más fehérjetermészetű molekulákat célzó monoklonális antitesteket (tumornekrózis faktor- α antagonistá inliximab kiméra antitest) (1).

A korábban alkalmazott hagyományos peptid-szintetizáló eljárások helyett (2) ma különböző eredetű sejt kultúrákat és transzgén állatokat használnak a terápiás vagy kutatási célra szánt rekombináns fehérjék ipari mennyiségű előállítására. Az eljárás lényege, hogy élő szervezetben termeltetik a fehérjét egy mesterségesen bevitt gén alapján. A gén sejtbe jutása egy vektornak nevezett DNS-molekula segítségével történik. A fehérjetermelésre használt expressziós vektorok viszonylag alacsony kópiaszámban replikálódnak a gazdasejtben, és olyan szabályzó elemeket tartalmaznak, melyek lehetővé teszik a bejuttatott gén által kódolt fehérje gazdasejtben való kifejeződését. A rekombináns DNS-konstrukció létrehozása során mind az előállítani kívánt fehérjét kódoló DNS-t (inzerit), mind a vektort azonos restriktív endonukleázzal kezelik. Ezek az enzimek meghatározott nukleinsav-szekvenciák mentén hasítják a DNS-t, így a komplementaritás elve szerint az in-

zert és a vektor végei könnyen összekapcsolhatóak.

Az alkalmazott expressziós rendszert az előállítani kívánt fehérje és az expressziós organizmus tulajdonságaihoz szükséges optimalizálni. Az első és mindmáig az egyik leggyakrabban használt módszer a bakteriális (*Escherichia coli*) expresszió. Ezzel az eljárással nagy mennyiségű és gyors rekombináns fehérjetermelés érhető el, azonban a prokarióta sejtek sajátosságai miatt a nagyméretű, bonyolult térszerkezetű, illetve poszttranszlációs módosításokat igénylő fehérjék nehezen állíthatók elő ilyen rendszerekben.

Megoldást jelenthet a problémára a fehérje élesztősejtekben (*Saccharomyces sp.*, *Pichia sp.*) való expresszáltatása, mely szintén nagy mennyiségű fehérjetermelést biztosít. Az élesztők poszttranszlációs mechanizmusai jól ismertek, használatukkal az eredeti emlős célfehérjéhez jobban hasonlító rekombináns fehérjetermék állítható elő. Hátrányuk, hogy az élesztő rendszereket bonyolultabb optimalizálni és fenntartani. Ezen kívül az élesztők a fehérjéket hiperglikozilálják, melyhez az emlős sejtektől eltérően csak mannóz oldalláncozat használnak, ezért az így termeltetett natív rekombináns fehérjék emlősökben erős antigén tulajdonságúak lehetnek.

Kifejezetten jó emlősfehérjékhez való hasonlóság érhető el rovarsejtes expressziós rendszerekben. A leggyakrabban alkalmazott ilyen módszer a bakulovírus rendszer (3). A bakulovírusok bagolylepke fajokat fertőznek, genomjuk kb. 80–100 kbp

méretű cirkuláris, duplaszálú DNS. Az immortalizált molylepkesejtekben a vírusvektorba inzertált gén által kódolt fehérje expressziója csak a vírusfertőzés kései szakaszában jön létre, és igen jó hozamot ad. Az immortalizált molylepke sejtekben a vírusvektorba inzertált gén által kódolt fehérje expressziója csak a vírusfertőzés kései szakaszában jön létre, és rendkívül jó hozamot ad (4). Az emlőssejtekben végezett rekombináns fehérjetermelés hozama elmarad az eddig említettekéhez képest, valamint a vektorok összetétele is bonyolultabb, ezért ezeket a rendszereket ritkábban, főként kutatásban alkalmazzák. A mesterséges DNS-konstrukciót emlőssejtekbe juttatva a rekombináns gén expressziója átmeneti, néhány nap múlva lecseng. A probléma kivédése érdekében a vektort az inzerttel együtt a gazdasejt genomjába integrálhatjuk, ezzel a gén stabil overexpressziója érhető el.

A humán terápiás fehérjék előállítására a fent ismertetett heterológ expressziós módszerek mellett egyéb lehetőségek is rendelkezésre állnak. Fehérjék expresszáltathatóak növényi vagy humán sejt-kultúrák, valamint transzgenikus növények, illetve állatok segítségével is. Szilárd fázisú peptidszintézissel ma még csak a rövid oligopeptidok szintézise gazdaságos, azonban a rendszer optimalizálása a módszert nagyobb fehérjék előállítására, így az egyre növekvő rekombináns fehérjeszükséglet kielégítésére is alkalmassá teheti.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A közlemény az OTKA K116928, PD105361 és LP008/2016 pályázatok támogatásával készült.

Summary

Expression systems for recombinant protein production

Takács IM¹, Rokonyai R¹, Lippai R¹, Sziksz E^{1,2}, Szabó JA^{1,2}, Vannay Á^{1,2}

¹ 1st Dept. of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

² MTA-SE, Pediatrics and Nephrology Research Group, Budapest, Hungary

Due to the broad application of proteinaceous biological substances the need for biotechnologically produced recombinant proteins is rapidly increasing. The aim of our present review is to briefly summarize the most commonly used protein expression systems and introduce some future directions.

KEYWORDS recombinant protein, expression systems

Irodalom

1. Poppel K, Crawford D, Beutler B. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *J. Exp. Med.* 1991; 174 (6): 1483–9.
2. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 1963; 85 (14): 2149.
3. Shu-ron L, Hua-lin W, Zhi-hong H, Fei D. Genetic modification of Baculovirus Expression Vectors. *Virologica Sinica*, 2012; 27 (2): 71–82.
4. Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013; 23 (3): 393–402.

Útvaló tudnivaló

- Rekombináns proteinexpresszió során a fehérjéket élő szervezetben termeltetik egy mesterségesen bevitt gén alapján.
- Az így módon előállított proteinek humán fehérjékhez való hasonlósága, terápiás alkalmazhatósága nagyban függ az alkalmazott expressziós rendszer típusától.

Tesztkérdések

1. Miért nem ajánlott az élesztők által termelt rekombináns fehérjék közvetlen humán használata? (Csak egy helyes megoldás található a válaszok között.)

- a) Az élesztők megváltoztatják a fehérjék aminosavsorrendjét.
- b) Saját fehérjéikkel konjugálják a rekombináns fehérjét.
- c) Az eltérő folding miatt a rekombináns fehérje térszerkezete nem megfelelő.
- d) Az élesztők sajátosan glikozilálják a fehérjéket, így azok jelentősen immunogének lehetnek.
- e) Az élesztő rendszerekben nem működnek a poszttranszlációs módosítások.

Az egyszerű választásos tesztekre a megoldást a társaság honlapján kérjük megjelölni: www.gyermekorvostarsasag.hu.