# 12. Expressziós rendszerek

A molekuláris biológiai munkák egyik fontos feladata, hogy a gének „megszólaltatásával” **fehérjéket termeljenek**. E fehérjéknek a működését *in vivo* és *in vitro* is tanulmányozhatjuk, de akár ipari (például gyógyászati) célra is fel lehet őket használni. Ebben a fejezetben a fehérjék előállításának legismertebb és leggyakrabban alkalmazott technikáit szeretnénk ismertetni, kiemelve a technikák felhasználhatóságát, előnyeit, hátrányait. Elsősorban a baktériumsejtben, az élesztőben, bakulovírus segítségével rovarsejtekben, valamint emlőssejt-tenyészetekben történő fehérje-túltermelési módszereket ismertetünk. Bár léteznek más expressziós rendszerek is (növényi sejtekben, nyálkagombákban, Drosophila-sejtekben stb.), de ezeket kisebb jelentőségük miatt nem tárgyaljuk. Szabadföldi növényekben is lehetséges gazdaságosan előállítani bizonyos fehérjéket, de ez igen időigényes, és többnyire komoly ipari kapacitásra van szükség a fehérjék kinyeréséhez, tisztításához.

Első lépésben a megfelelő hosszúságú, a fehérjét kódoló DNS-t (többnyire cDNS-t) kell az **expressziós vektorba** klónozni. A fehérje termeltetéséhez igényeinknek és a lehetőségeknek megfelelően használhatunk erős vagy gyenge, konstitutív vagy indukálható **promótereket**. Megfelelő szignál szekvenciák N-terminálishoz történő fúziója meghatározhatja a termelt fehérje végső helyét: citoplazmába, valamilyen sejtorganellumba, vagy a sejten kívülre. A fehérje detektálása, tisztítása, vízoldhatóbbá tétele érdekében további **speciális fehérjedoméneket** kódoló DNS-szekvenciákat fuzionáltathatunk a cDNS-ünkhöz (lásd alább). Többnyire eukarióta (főleg emlős, emberi) eredetű fehérjéket szoktak overexpresszálni, ez az expressziós rendszer kiválasztásánál fontos szempont lehet.

Bár még kevéssé elterjedt technológia, a jövőben valószínűleg egyre fontosabb szerepet fog betölteni a szintetikusan előállított génekről történő fehérjeexpresszió. A szintetikus DNS-t számítógép segítségével úgy tervezik meg, hogy a fehérjeszintézis szempontjából optimális legyen a kodonösszetétele (az azonos aminosavakat kódolók arányosan oszoljanak el az adott tRNS-mennyiségek függvényében), és a kodonok egymáshoz viszonyított helyzete (ehhez az egymás után érkező tRNS-ek kölcsönhatásait kell figyelembe venni). Az új fehérjék tervezése során akár elhagyhatóak a működésükhöz szükségtelen részek, vagy megváltoztatható az adott fehérjék specifitása, szabályozhatósága. Természetesen ehhez rengeteg tapasztalati információra van szükség az adott fehérjéről és a genetikai változtatások várható élettani eredményéről. Ezeket az információkat számítógépes adatbázisok formájában tárolják, amelyeket a tervezéshez szükséges, fejlett tervezőprogramok tudnak használni.

## 12.1. Expressziós vektorok

Milyen részekből állnak az expressziós vektorok? Az egy vagy több replikációs origón kívül mindig megtalálható benne valamilyen **antibiotikum-rezisztencia gén** (ampicillin, kanamicin, tetraciklin), egy olyan rész, ahová a gén cDNS-e beültethető (többnyire **MCS**, lásd: 10. fejezet), ez előtt pedig egy **promóter-régió**, a hozzá kapcsolódó régiókkal (pl. operátor-régió) kiegészítve. Gyakran találhatók még a vektorokban olyan peptidek vagy fehérjék DNS-szekvenciái, amelyek a termelődő fehérjéhez kapcsolódva annak **detekcióját** vagy **tisztítását** könnyítik meg (ezeket fúziós jelölésnek vagy **fúziós „tag”**-nek hívjuk). Amennyiben a fehérje C-terminálisára nem lesz extra szakasz fuzionáltatva, az MCS végére szoktak három különböző leolvasási keretben egy-egy **STOP-kodon** szekvenciát elhelyezni.

Nézzük most az ún. fúziós „tag”-eket, hogy mi mindenre lehet őket használni. **Affinitás kromatográfiával** történő tisztításhoz általában háromféle „tag”-et használunk: a maltóz-kötő fehérjét (**maltose-binding protein**, MBP), a **glutation-S-transzferázt** (GST), és a hat konszekutív hisztidinből álló, ún. **6xHis-tag**-et.

A **MBP** 42,5 kDa protein, maltózhoz, vagy annak polimerjéhez, az **amilózhoz** képes nagyon specifikusan kötni. Az amilózt kovalensen kötik a kromatográfiás oszlop gyöngyeihez. A MBP-fúziós fehérjék **vízben való oldhatósága** jelentősen **megnőhet** (a „tag” nélküli fehérje oldhatóságához képest), ezért előszeretettel alkalmazzák bakteriális expressziós rendszerekben. A fúziós „tag” révén az oszlophoz **specifikusan kötődnek** a rekombináns fehérjék. Kötődés után az oszlopról az aspecifikusan kötődő szennyeződéseket lemossuk, majd az általunk termeltetett, fúziós fehérjét maltóz hozzáadásával eluálhatjuk. A tiszta fúziós fehérjét így már különböző vizsgálatoknak lehet alávetni (12-1. ábra)

12-1. ábra

https://www.neb.com/~/media/Catalog/All-Products/FF91B67397D945E0956F3483174CF7E3/Long%20Description/E8200a.jpg

2013.10.08.

A mosás általában valamilyen (akár többféle, egymást követő) pufferrel történik. Ez a folyamat az aspecifikusan az oszlophoz kötődött molekulák (pl. más fehérjék) eltávolítására szolgál. Az elúció során **kompetíció** révén a nagy mennyiségű szabad maltóz leszorítja a maltózkötő tag-gel rendelkező fehérjét az amilóz oszlopról.

A **GST-fúziós fehérjék** az oszlophoz kovalensen kötött **glutationhoz (GSH)** kötnek specifikusan. A GST egy 26 kDa protein, a fúziós tag segítségével történő fehérjetisztítás folyamata a MBP-éhez hasonló, csak ebben az esetben **szabad glutationnal** történik a fúziós fehérjék elúciója (12-2. ábra).

12-2. ábra

http://1.bp.blogspot.com/-ch\_i3COHnPs/Te\_Xc48QsjI/AAAAAAAAAiM/eZN9oXY84J0/s1600/Biofreaks+-+GGS+LIVE+-+Protein+purification+from+E.coli+-+Elution.jpg

2013.10.08.

A **6xHis-tag** az előzőeknél jóval **rövidebb** peptid, kevésbé változtatja meg az termeltetett fehérje méretét. A hisztidin **nikkel-ionokhoz** képes koordinatív kötéssel kapcsolódni; minden nikkel-ionhoz 2 hisztidin kapcsolódhat. A nikkel-ion 6 koordinatív kötésben vehet részt; a másik négy vegyértékével a gyantára kötött nitril-triacetáthoz kapcsolódik. A fúziós fehérje a hat hisztidinnek köszönhetően specifikusan kötődik a nikkel-ionokat tartalmazó oszlophoz, amelyről alacsony (60 mM) koncentrációjú imidazollal történt mosás után magas (300–600 mM) koncentrációjú **imidazollal eluálható**.

Nemcsak a nikkel, de többféle kétértékű kation is képes a hisztidinhez kötni. Különféle rendszerekben kobalt-, ill. rézionokat is használhatnak fehérjekötésre. A specificitás és a kötődés erőssége közösen határozzák meg ezen ionok felhasználhatóságát. A nikkel-ionok még elég specifikusan, és már megfelelően erősen is kötődnek a hisztidinhez, ezért őket használják a leggyakrabban fehérjetisztítások során.

12-3. ábra

http://www.agr.kuleuven.ac.be/dp/logt/practicum2001/proef9b.gif

2013.10.09.

A tisztításhoz használt fúziós tag-ek gyakran akadályozzák a termeltetni kívánt fehérje natív szerkezetének, vagy a működésének vizsgálatát, ilyenkor azoktól érdemes megszabadulni. Ez akkor lehetséges, ha a termeltetni kívánt fehérje és a fúziós tag DNS-szekvenciája közti részen kódolva van egy olyan pepdidszekvencia, amelyet valamilyen proteáz specifikusan felismer, és elhasít (úgy képzeljük el, mint a restrikciós endonukleázokat a DNS-hasításakor). A gyantához specifikusan kötődő fehérje ilyenkor nemcsak elúcióval, hanem proteázos hasítással is mobilizálható (12-1. ábra, 12-2. ábra). A gyanta utána elucióval regenerálható, és újra használható. A specifikus proteázok közül a legjobban ismertek a véralvadási kaszkád proteázai. A legtöbb esetben **trombin**, vagy **X faktor** felismerőhelyeit alkalmazzuk, de létezik olyan rekombináns proteáz is (**PreScission**), amely a termeltetett fehérje C-terminálisán egyetlenegy extra aminosavat sem hagy (a proteáz a felismerő-helyének N-terminálisán hasít), ezáltal pontosan a kívánt aminosav-szekvenciájú fehérje tisztítható affinitáskromatográfiával. A rendszerben maradt proteázokat gyöngyökhöz kötött, specifikus **antitestekkel** kötjük meg, amelyek így centrifugálással eltávolíthatóak. Ha rekombináns úton előállított proteázunk (akár az elvágandó, tisztított fúziós fehérjével megegyező) fúziós tag-et tartalmaz, antitest helyett a tag-hez kötődő, gyöngyhöz immobilizált ligand segítségével is eltávolítható a rendszerből (12-4. ábra). Ilyenkor a fúziós fehérjénket a proteázos emésztés előtt eluáljuk az affinitásoszlopról.

12-4. ábra

http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Literature/Waugh2011.pdf

2013.10.09.

Nem csak a tisztíthatóság vagy az oldhatóság elősegítése lehet a tag-ek feladata. Megfelelő antitestek hiányában gyakran előfordulhat az, hogy a termeltetett fehérje jelenlétét, mennyiségét nem lehet detektálni. Ha a fehérjéhez ismert immunogenitású, **8-10 aminosav hosszú peptidet** fuzionálunk, akkor azt a peptid ellen termeltetett, a biotechnológiai cégeknél megvásárolható antiesttel ki lehet mutatni. Ilyen **immunogén tag**-ek például a Myc-, a FLAG-, a HA- és a V5-tag.

Az expresszáltatott fehérje sejten belüli, *in vivo* kimutatáshoz más módszert kell alkalmazni. Ilyenkor a fehérjéhez ismert enzimatikus, vagy fluorszcens tulajdonságokkal bíró fehérjéket kell fuzionáltatni. Ilyen enzim például a **luciferáz**, mely a sejtbe juttatott luciferint bontva fény kibocsátását katalizálja, ezáltal megmutatja a fehérje sejten belüli, vagy a szervezeten belüli elhelyezkedését. A másik, hasonló feladatra használt fehérje a **green fluorescent protein (GFP)**, mely adott hullámhosszú fénnyel gerjesztve zöld fényt bocsát ki (12-5. ábra).

12-5. ábra

https://lh6.googleusercontent.com/-EZbr0GM7Pg0/TmudbUAhInI/AAAAAAAAB2I/sCsYcaVFr10/w500/GFP.jpg

2013.10.09.

## 12.2. Expresszió baktériumsejtekben

A baktériumokban történő fehérjetermeltetés nagy előnye, hogy **olcsón, gyorsan, nagy mennyiségű** fehérje termeltethető ezen az úton. Ha ezek a legfontosabb szempontjaink, mindenképp mérlegelnünk kell ezt a fehérjeexpressziós alternatívát. Hátránya lehet, hogy a fehérjék poszttranszlációs módosulásai (például glikoziláció) hiányt szenvedhetnek. Szintén gyakran előfordul, hogy a termelődött fehérje a fázisok szétválasztásakor vízben oldhatatlannak bizonyul.

A termelt fehérje mennyiségének növelése érdekében fontos a megfelelő *E. coli* törzs kiválasztása. Fehérjeexpresszióra leggyakrabban talán a **BL-21(DE3)** törzset alkalmazzák, mely egyrészt bizonyos bakteriális proteázokra deficiens (kevésbé degradálódik a már megtermelt fehérje a baktériumon belül), másrészt termeli a T7-fág RNS-polimeráz enzimét (ez T7 promóterrel meghajtott gének esetében fontos).

A baktériumokban használatos expressziós vektorok legtöbbször **lac promótert** és operátort, vagy **T7 promótert** (amely erősebb, mint a lac promóter) és lac operátor régiót (lásd: 10. fejezet) találunk. Ha a baktériumban található lacI gén, amelyről az operátor régióhoz kapcsolódó, gátló fehérje konstitutívan termelődik, akkor szabályozhatóvá válik a fehérjénk termelődése (12-6. ábra). A szabályozhatóság azért lehet fontos, mert a kontrollálatlan overexpresszió a baktérium **szaporodásának akadályozásához** (felemészti az erőforrásokat), sokszor a **baktérium pusztulásához** vezethet (például átjárhatóvá teszi a sejtmembránt vagy aspecifikusan kapcsolódva más struktúrákhoz, akadályozza az anyagcserét). A megtermeltetett fehérjét többnyire a baktériumszuszpenzió feldolgozásával nyerjük ki.

12-6. ábra

http://www.origene.com.cn/assets/Images/TrueORF/pEX-N-GST.jpg

2013.10.09.

A baktériumokat **középső log fázisig** (OD600~0,5-0,6) szoktuk szaporítani (ezt éjszakára leoltott és felnőtt baktériumkultúra reggeli kihígításával, és a szaporodás folyamatos monitorozásával lehet nyomon követni), ezután következik az IPTG-vel történő **indukció**. Az indukció többnyire 2–6 óra hosszat tart (néha tovább), ezalatt termelődnek meg az általunk használni kívánt fehérjék. Ha túl sokáig tart az indukció, akkor a termelődött fehérjék egyrészt részlegesen lebomolhatnak, másrészt óriási mennyiségük miatt egyszerűen elpusztítják a baktériumsejteket. Ezért hosszabb indukciós idő alatt néha **alacsonyabb hőmérsékletet** (30 °C) használunk, hogy a fehérjék degradációját megakadályozzuk (a proteázok kevésbé működnek). Az indukció végén a sejtszuszpenziót lehűtik, és a továbbiakban alacsony hőmérsékleten **(jégen) dolgozunk**. A sejteket centrifugával történt ülepítés után foszfát-pufferben (PBS) szuszpendáljuk, majd proteáz-inhibitorok és detergensek hozzádása után feltárjuk (többnyire ultrahangos „szonikálással”). **Nukleázok** alkalmazása opcionális. Alternatívaként a feltáró pufferbe **sejtfal-emésztő enzimeket** (lizozim) teszünk, majd a sejtfaluktól megszabadított sejteket nyíróerő alkalmazásával (vortex, fecskendő) durrantjuk szét.

A baktériumsejtek feltárása és a sejttörmelék eltávolítása (ülepítés centrifuga segítségével) után a felülúszóhoz adjuk a speciális ligandot (amilóz, GSH, nikkel) tartalmazó gyantát. Hidegben történő inkubációt (körülbelül 1 óra) követően a gyantát pufferrel többször mossuk, majd megtörténhet a fúziós fehérje elúciója, vagy lehasítása.

Ha a fehérje (akár a megfelelő proszttranszlációs módosítások hiánya miatt) hidrofób részeket tartalmaz, akkor előfordulhat, hogy a centrifugálást követően nem a felülúszóban, hanem a sejttörmelékben (**zárványtest**, „**inclusion body**”) marad. Ilyenkor megkísérelhetjük a **szolubilizálását** többféle módon, akár a különböző módszerek kombinációjával: **kaotróp anyagokkal** (5–8 M **guanidin-HCl** vagy 6–8 M **UREA**), erős **detergensekkel** (SDS), a pH növelésével vagy csökkentésével, szerves oldószerek használatával (például acetonitril/propanol keverékkel), vagy mechanikusan (szonikálással, vagy hirtelen nagy nyomáscsökkenést produkálni képes, ún. „**French press**”-szel).

Természetesen a fehérjét szolubilizálás után natív körülményekhez közeli állapotba kell hozni (**renaturálni kell**). Többnyire lassú, néha **többlépéses dialízissel** cserélik le a szolubilizáló puffert, ilyenkor az erős detergenseket is gyengébbekre cserélik a dialízis során. Dialízis helyett **gélszűréssel**, vagy az **oldószer** koncentrálási lépésekkel egybekötött **folyamatos lecserélésével** is lehet próbálkozni, a lényeg, hogy a fehérjék az oldatban maradjanak, ne csapódjanak ki. Az egyik legsikeresebb renaturációs eljárás, ha az **affinitásoszlophoz kötődő fehérjén** cseréljük le a szolubilizáló puffert. Legegyszerűbben ezt a **6xHis-taggel rendelkező fehérjéknél** alkalmazhatjuk, hiszen a hisztidin-oldalláncok nikkelhez kötődését az oldatban lévő kaotróp anyagok nem akadályozzák.

A fehérjék kicsapódását akadályozhatja aminosavak, polietilén-glikol, szacharóz, foszfolipidek, fémionok, DTT, valamint oxidált/redukált glutation megfelelő koncentrációban történő alkalmazása. A fehérjék megfelelő minőségben/mennyiségben történő kinyerése zárványtestből empirikus kísérletezés eredménye, szinte nem is használható ugyanaz a recept két különböző fehérje esetében.

A fehérjeexpresszióra kiválóan alkalmas BL-21(DE3) *E. coli* törzs szekréciós aktivitása igen kicsi, ezért az expresszálódott fehérjék döntő többségben a sejtplazmában maradnak. Az utóbbi időkben azonban egyre több olyan konstrukciót állítottak össze, amelyekben a fúziós fehérje- vagy peptidrész a periplazmás térbe, vagy a tápoldatba orientálja a termeltetett fehérjét. Ez megkönnyíti a fehérjék tisztítását, a periplazmás tér oxidatívabb közege pedig az interamolekuláris diszulfid-hidak kialakulása révén elősegítheti a termeltetett fehérje oxidatív feltekeredését.

## 12.3. Fehérjetermelés élesztőben

Az élesztőben történő fehérjetermeltetés előnyei közé tartozik, hogy bár kevésbé gyors, mint a baktériumban történő expresszió, mégis viszonylag olcsó, és **nagy mennyiségű fehérjét** produkál (a termelt fehérje mennyisége akár meg is haladhatja a baktériumok produkcióját). Baktériumokhoz képest előny, hogy az expresszió akár oxigén hiányában is működhet, a termeltetett fehérje megjelenési helye szabályozható (sejtorganellumokba, tápfolyadékba), és az élesztő jól karakterizált **poszttranszlációs módosításaival** az emlősfehérje natív szerkezetéhez jobban hasonlító fehérjét termelhet. Hátrányai: 1. Lassabb szaporodási rátája miatt jóval nehezebb és időigényesebb megtalálni a log-fázis optimális időpontját az indukcióhoz, 2. Az élesztő expressziós rendszerek elkészítése, beállítása és működtetése jóval bonyolultabb a bakteriális rendszereknél, 3. Emlősfehérjékhez képest a glikán oldalláncok sokkal kiterjedtebbek, az élesztők „**hiperglikozilálják**” fehérjéiket az emlősökéhez képest, ráadásul a glikánok építőkövei is részben mások, mint az emlősfehérjék esetében.

Az élesztők között vannak olyan fajok, amelyek alkalmasabbak fehérjék overexpressziójára, mint a közönséges sörélesztő. A **Pichia** fajok (például *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*) tartalmaznak egy olyan enzimet (**alkohol-oxidáz**, **AOX**), amelynek segítségével viszonylag magas koncentrációjú metanolt tartalmazó tápoldatban is életben tudnak maradni. Az alkohol-oxidáz termelődését ráadásul a **metanol indukálja** (hasonlóan, mint baktériumsejtekben az IPTG a lac operon esetében), lehetőséget adva arra, hogy az AOX promóter-régiót indukált fehérjetermeltetésre használják.

A fehérje-overexpresszióhoz használt Pichia törzsek **proteáz-deficiensek** (hogy a megtermeltetett fehérje nehezebben degradálódjon), és többnyire jó néhány aminosavra, nukleotidra **auxotrófok** (az auxotrófia megszűnésével tudjuk a pozitív klónokat szelektálni). Kevés saját fehérjét szekretálnak, így szekretálódó fehérjék termeltetését követően szinte csak a mi rekombináns proteinünket találjuk a tápoldatban, megkönnyítve ezzel tisztítását. A Pichia törzsekben főleg N-glikánok keletkeznek, nincs hiperglikoziláció. 1,3-kötésű glikánok nem keletkeznek, ezért a Pichiákban termeltetett fehérjék **kevésbé immunogének** (gyógyászati célra alkalmasak).

A Pichiában termeltetett fehérje cDNS-ét erre a célra készített expressziós plazmidba kell ültetni. A plazmidban található replikációs origó és antibiotikum-rezisztencia gén, hiszen a konstrukciót baktériumban szokták felszaporítani. Az élesztőben történő szelekcióhoz található benne valamely, **aminosav-** vagy nukleotid-**anyagcseréhez** szükséges **enzim génje** (akár több is). (Ha nem auxotróf törzzsel dolgozunk, szelekcióra használhatóak például a zeocin és blasticidin antibiotikumok is.) A klónozó-kazetta (legtöbbször restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit tartalmazó MCS) előtt található az **AOX1 promóter**, mely glükóz jelenlétében nem működik, viszont glükóz hiányában és metanol jelenlétében igen. Ha fehérjénket a tápfolyadékba akarjuk termeltetni, akkor cDNS-ét olyan vektorba kell illesztenünk, amely a MCS előtt tartalmazza a sörélesztő **α-**(mating)**faktor** DNS-szekvenciáját (12-7. ábra). A termelődött fúziós fehérje a szignál peptid jelenléte miatt szekretálódni fog.

12-7. ábra

http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V19520

2013.10.09.

A genetikai manipuláció eredményeképp létrejött, a transzgént hordozó konstrukciót baktériumban történő felszaporítást követően tisztítjuk, majd többnyire restrikciós endonukleáz segítségével **linearizáljuk**. Erre azért van szükség, mert a nyílt DNS (a szakadás helyén) könnyebben rekombinálódik a genommal, mint a cirkuláris. (Plazmid formájában a bejuttatott DNS eukariótákban többnyire nem tud szaporodni, integrálódnia kell a genomba.) A transzformációt érdemes sejtfal nélküli **szferoplasztokon** vagy **elektroporáció** segítségével végezni, a Pichia törzsek ugyanis kevéssé transz formálhatóak a sörélesztő esetén gyakran használt kémiai módszerekkel (PEG, LiCl). A megfelelő mennyiségben és hatásfokkal transzformálódott konstrukció akár több példányban is **integrálódhat a genomba**, a homológ szakaszok (pl. AOX1, HIS4) közti rekombináció eredményeképpen. A több transzgént hordozó genom nagyobb mennyiségű idegen fehérjét is fog termelni; egyre növekvő szelekciós nyomás alkalmazása, Southern blot, dot blot, real-time PCR vagy az expresszió monitorozása segít kideríteni, hogy a szelekciót túlélt klónok közül melyek tartalmazzák a legtöbb beültetett kópiaszámot, melyek a legalkalmasabbak fehérjetermeltetésre.

A Pichia törzsek glükózos táptalajon gyorsan szaporodnak. Az indukció előtti nap éjszakára a glükózos táptalajt **glicerinesre** kell cserélni, hogy a glükóz jelenléte ne akadályozza az AOX promóter működését. Másnap **0,5% metanolt** tartalmazó tápoldatba tesszük a sejteket, amely az AOX1 promóteren keresztül indukálja a transzgén expresszióját. Ilyenkor nagyon fontos a megfelelő levegőztetés: a sejtkultúra térfogata maximum 10–30%-a legyen a flaska térfogatának, és a flaska tetején a kupak ne legyen túl szoros. Az indukció **akár több napig** is eltarthat. Minden 24. órában mintát kell venni az expresszió monitorozásához, és a metanol fogyása miatt a sejteket újra kell indukálni. A megfelelő időpontban azután megtörténik a **sejtek feltárása enzimesen** (pl. zymolyase vagy lyticase enzimek segítségével), vagy **mechanikusan** (French press, üveggyöngyökkel történő rázatás, fagyasztás/olvasztás ciklusok használatával). Centrifugálás után a felülúszót ugyanúgy kezeljük, mint ahogy azt a baktériumok esetében láttuk (affinitásoszlopon kötik ki a specifikus fehérjéket). Ha az élesztő a médiumba szekretálta a fehérjét, akkor a médiumból centrifugálással eltávolítjuk a sejteket, a maradék törmeléket kiszűrjük, majd a médiumot átengedjük az affinitásoszlopon. Az oszlop mosása, a fehérje elúciója/emésztése a már megismert módokon zajlik.

## 12.4. Fehérjeexpresszió bakulovírus segítségével

A rovarsejtben történő fehérjetermeltetés legismertebb fajtája a bakulovírus segítségével működő expressziós rendszer. A bakulovírus az *Autographa californica* lepke ún. nukleáris polihedrózis vírusa. Az expresszió a *Spodoptera frugiperda* molylepke lárvájának **petefészkéből nyert, immortális sejtvonalaiban** történik (Sf9 vagy Sf21 sejtvonalak). Ezek a sejtvonalak letapadó és szuszpenziós kultúrában is képesek tenyészni. A sejtek speciális körülmények között, **27-28 °C-os** termosztátban, szérummentes (vagy alacsony szérumkoncentrációjú) „Grace’s insect cell culture” médiumban, pH: 6,1–6,4 közötti kémhatáson tenyésznek. A vírus módosított, de még életképes virionokat gyártani képes genomjába (**bacmid**) egy nem esszenciális fehérje génjének a helyére illesztik az expresszáltatni kívánt fehérje cDNS-ét, amelyről a vírus életciklusa során a rovarsejtben átíródik a fehérje. Mivel a vírusok replikálják magukat, a rovarsejt pusztulásával igen sok fertőzőképes vírushoz juthatunk. A technika alkalmazása során nem az első, hanem az összegyűjtött vírusokkal végzett második vagy harmadik fertőzési ciklus során termelődött fehérjéket tisztítják a sejtekből.

A bakulovírus segítségével történő expresszió előnye, hogy viszonylag olcsón, viszonylag **gyorsan**, nagyon **nagy mennyiségű fehérjét** termeltetünk. (Azért ipari méretű fehérjetermelésre nem használható, ellentétben pl. az élesztővel.) Ráadásul a rovarsejtek poszttranszlációs mechanizmusai nagyon hasonlóak az emlősökéhez; még a fehérjék glikánjainak mintázata is jobban hasonlít az emlősökére, mint az élesztőben termeltetett fehérjéké. Mivel a vírus genomja igen nagy, még genomi DNS-eket is képes magába fogadni, a splicing mechanizmusa a rovarsejtben lezajlik.

A transzgén klónozása a bacmidba rekombináción alapul. A kifejezni kívánt gént valamely, korábban már ismertetett klónozási módon egy speciális plazmidba illesztjük, amelyben az expressziós kazetta két végén a vírusvektorral homológ, transzpozícióra alkalmas szekvenciák (Tn7R, Tn7L) találhatóak. A gén előtt található az ún. **polihedrin gén promótere** (12-8. ábra). A promóter akkor aktív, amikor a vírus kapszidjához szükséges fehérjék szintézise folyik. (A polihedrin a bakulovírus kapszidjának több mint 50%-át kitevő fehérje.) A vírusvektor (bacmid) egy kör alakú **óriásplazmid**, amely tartalmaz antibiotikum-rezisztencia gént és az előbb említett homológ szekvenciákat. A homológ szekvenciák a LacZα peptidjének a génjébe lettek integrálva úgy, hogy a génről termelődő fehérje megtartotta a működését. A bacmidot, a kifejezni kívánt gént tartalmazó **donor plazmidot**, és egy ún. **helper plazmidot** ugyanabba a baktériumsejtbe kell juttatni. Mivel mindhárom plazmidon van antibiotikum-rezisztencia gén (három különböző), három antibiotikumra **együttesen kell szelektálni** a klónokat. A helper plazmidról expresszálódik a **transzpozáz enzim**, mely az inzert bacmidba kerülését katalizálja. A sikeres transzpozíció kék-fehér szelekcióval detektálható. A már csak a bacmid megmaradásához szükséges antibiotikumon tenyésztve a pozitív klónt, a másik két plazmid szelekciós nyomás hiányában eltűnik; a baktériumból plazmidot izolálva tisztán megkaphatjuk a transzgént tartalmazó bacmidot.

12-8. ábra

https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/gallery/high/575.jpg

2013.10.09.

A bacmidot ezek után rovarsejtekbe (Sf9 vagy Sf21) **transzfektáljuk**. A bejuttatott DNS megfertőzi a sejteket; a bacmidok **replikálódnak**, majd vírus **kapszidfehérjéket** termelnek. Mivel a transzgén is kapszidfehérje promótere mögé van ültetve, a **kapszidfehérjékkel egyszerre** termelődik az általunk kívánt fehérje is. A bacmid a kapszidba pakolódik, és mint fertőzőképes vírus hagyja el a lizálódó sejtet. A fertőzéstől a sejt pusztulásáig tartó ciklus néhány nap alatt lezajlik. A kiszabaduló vírusokat összegyűjtjük, koncentrációjukat (titerüket) meghatározzuk, majd újabb rovarsejteket fertőzünk velük. A fertőzéskor viszonylag **nagy víruskoncentrációt** használunk. A második (és még inkább a harmadik) fertőzési ciklus végén termelődő fehérjéket a pusztulófélben lévő sejtek detergenssel történő lízisével nyerhetjük ki (12-9. ábra). A megtermeltetett fehérjék hasonló módon tisztíthatóak, mint ahogy azt láttuk a bakteriális fehérjeexpresszió esetében.

12-9. ábra

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf

2013.10.09.

## 12.5. Expresszió emlőssejt-tenyészetekben

Mivel *in vitro* szerkezeti vizsgálatokhoz, vagy ipari (gyógyászati) célra nagy mennyiségű fehérjére van szükség, ezekre a célokra korábban emlőssejt-tenyészeteket nem használtak, azok alacsony kitermelési rátájuk miatt. Az utóbbi időben azonban egyre újabb sejtvonalak és tenyésztési feltételek kidolgozásával lehetővé vált emlős sejtkultúrákat használni nagyobb mennyiségű fehérje termeltetésére is. Emlőssejteket expresszióra használni akkor van értelme, ha a poszttranszlációs módosulások annyira fontosak, hogy már egy kicsiny különbség az eredeti fehérjéhez képest (pl. a fehérjéhez kötődő glikánok szerkezetében) is jelentős működésbeli különbséget okoz. A tudományos kutatás során emlős sejtvonalakban leginkább akkor expresszáltatunk fehérjéket, ha azoknak a **sejten belüli szerepét** szeretnék tanulmányozni *in vivo*. A fehérjék sejten belüli elhelyezkedését a vizsgálni kívánt fehérje génjéhez fuzionáltatott riportergének (luciferáz, GFP) segítségével tudjuk vizsgálni.

Az emlős expressziós vektorokban megtalálhatóak mind a bakteriális, mind az emlős rendszerekben történő szelekciót lehetővé tévő antibiotikum-rezisztencia gének. A fehérjék termeltetéséhez többnyire **erős** (általában virális) **promótereket** használnak, gyakran enhancer régiókkal kiegészítve (12-10. ábra). A vektorok tartalmazhatják a bakteriális fehérjeexpressziónál már ismertetett fúziós peptidek DNS-szekvenciáit, némely vektorban megtalálható a fehérjét különböző **sejtalkotókba irányító szignál peptidek** szekvenciája is.

A gerincesek fehérjéihez információt szolgáltató DNS-szakasz az ATG start-kodon környékén általában speciális, konzervatív, ún. **Kozak-szekvenciát** tartalmaz, amely ugyan csak néhány konzervált nukleotid, nélkülük a transzláció többnyire nem, vagy csak kisebb hatásfokkal indul el. Más eukariótákban is találhatók Kozak konszenzus-szekvenciák, amelyek azonban különbözhetnek a gerincesekétől.

Eukarióta sejtekben a legtöbb plazmid nem képes szaporodni, csak ha a gazdasejt **genomjába integrálódik**. Transzfektált emlőssejtek esetén megkülönböztethetünk **tranziens** transzfektánsokat (ilyenkor a vektor nem integrálódott a genomba, az expresszió néhány napig, legfeljebb egy-két hétig vizsgálható) és **permanens** transzfektánsokat (ilyenkor a vektor a transzgénnel a genomba integrálódott). Az integrációt elő tudják segíteni egy **helper plazmid** transzfektálásával, mely egy **integráz enzim** génjét tartalmazza. Az integráció többnyire **homológ rekombinációval** zajlódik le; ha a transzgént tartalmazó vektor egy szakasza homológ az emlőssejt genomjának egy szakaszával, akkor akár az egész plazmid beleintegrálódhat a genomba. Az integráció sikerét szelekcióval tudjuk ellenőrizni: csak azok a sejtek lesznek hosszú távon antibiotikum-rezisztensek, amelyek genomjában a vektorban lévő antibiotikum-rezisztencia gén is megtalálható. A túlélő klónok az osztódásaik során keletkezett utódsejtekkel együtt piciny kolóniákat alkotnak a petricsésze alján. Ezeket a kolóniákat úgynevezett **klónozó-hengerek** segítségével fizikailag izoláljuk a többi kolóniától, leemésztjük a petricsésze aljáról, és új flaskában sejttenyészetet indítunk az azonos genotípusú sejtekből. Ez gyakorlatilag egy új sejtvonalnak tekinthető.

Emlőssejtekben történő fehérjetermeltetés esetén is követelmény lehet az indukálhatóság. Használhatjuk a baktériumokban már megismert sémát: vegyünk egy erős virális promótert (pl. citomegalovírus promóter, **CMV-promóter**), és illesszünk utána valamilyen operátor-régiót (például lac operon operátor-régióját). Ekkor egy második, gátló fehérjét (LacI) konstitutívan expresszáló plazmid jelenléte esetén az emlőssejtben nem termelődik az általunk kifejezni kívánt fehérje. Ha azonban a gátló fehérjét leszedjük az operátor régióról (pl. IPTG-vel), az átírás megindul. Többféle hasonló, vagy kicsit más elven működő konstrukciót fejlesztettek ki emlőssejtekben történő fehérjetermeltetés szabályozására.

12-10. ábra

http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K482001

2013.10.09.

## 12.6. Expresszió állatokban

Állatokban történő fehérjetermeltetésre akkor van szükség, ha **nagy mennyiségű** fehérjére van szükségünk (például a gyógyszeripar számára), és azon fontos a **tökéletes poszttranszlációs módosulások** jelenléte. A transzgenikus állatok előállítása igen bonyolult és lassú folyamat, erről részletesebben majd a következő fejezetben (13. fejezet) lesz szó. A fehérje termeltetését úgy kell megoldanunk, hogy az ne okozzon kárt az állat fejlődése során, és a termelt fehérje lehetőleg az állat elpusztítása nélkül kinyerhető legyen. Ez emlősállatokban viszonylag egyszerűen megoldható: **tejbe szekretálódó** fehérjéket kell előállítani. Ezt úgy lehet megvalósítani, hogy a kívánt fehérje cDNS-ének szekvenciájához **szekréciós szignált** illesztünk, és a célfehérje termelődését az **α-laktalbumin** vagy **β-kazein** génjének **promótere** szabályozza. (Az α-laktalbumin és a β-kazein kizárólag terhesség alatt, az emlő mirigysejtjeiben termelődő fehérjék.) Ezen a módon készül például a gyógyászatban a pancreatitis kezelésére használt fehérje, az α1-proteáz inhibitor. A tejből literenként akár 20 gramm α1-proteáz inhibitor is kinyerhető.

## 12.7. Sejtmentes fehérjeexpresszió

Ha nincs időnk expressziós rendszerek beállítására, és csak kis mennyiségű fehérjére van szükségünk, sejtmentes, *in vitro* fehérjetermeltetéssel is próbálkozhatunk. Ilyenkor a transzkripció és a transzláció is gyakran ugyanabban a tesztcsőben zajlik. A **gyorsaság** mellett a technika másik nagy előnye, hogy a **fehérjét** **könnyebb** a reakció után **tisztítani**.

Miket kell a reakciócsőbe tenni? Kétféle templátot használhatunk: mRNS-t (12-11. ábra), vagy cDNS-t. Az mRNS-t vagy tisztítottuk valamilyen sejtből, vagy *in vitro* transzkripcióval átírtuk valamely specifikus cDNS-ről. Az RNS átírásához szükségünk van valamilyen **fehérjeszintetizáló apparátusra**. Nagyon időigényes és drága lenne a szintézis összes alkotóelemét (tRNS, riboszóma, aminosavak, energia, enzimek, ionok, puffer stb.) egyesével mérni a reakciócsőbe, ezért ezt úgy oldjuk meg, hogy valamilyen **sejt** (leggyakrabban **búzacsíra** vagy **nyúl retikulocita**) teljes (detergens-mentes) **lizátumát használjuk** a reakcióhoz. A keveréket ki kell egészíteni megfelelő ionokkal (K+, Mg2+), aminosavakkal, ATP-vel, kreatin-foszfáttal és kreatin-kinázzal.

12-11. ábra

http://www.lifetechnologies.com

2013.10.04.

A nyúlból származó retikulociták *in vivo* elsősorban hemoglobint szintetizálnak (ez köti le fehérjeszintetizáló kapacitásuk 90%-át), igen nagy mennyiségben. (A retikulociták sejtmagjukat már elveszített, éretlen vörösvértestek. Nagy mennyiségű globin mRNS és fehérjeszintetizáló apparátus található bennük). A sejtlizátumot először Ca2+-dependens mikrokokkusz nukleázzal kezelik, amely degradálja az mRNS-eket. A Ca2+-ionok EGTA-val történő megkötésével inaktiválják a nukleázt, és ezt a lizátumot használják a transzlációhoz.

Nyúl retikulocita lizátum helyett igen népszerű alternatíva a búzacsíra lizátum használata. Nagy fehérjeszintetizáló apparátusa mellett viszonylag kevés saját mRNS-e van, az alacsony háttér miatt az exogén mRNS-ről termelődött fehérjéket könnyen lehet tisztítani. Búzacsíra lizátumot érdemes használni, ha a mintánk kontaminálva van rövid RNS fragmentumokkal, kétszálú RNS-ekkel, vagy oxidált tiolokkal, amelyek gátolnák a retikulocita lizátum megfelelő működését.

Gyakori problémát jelenthet, hogy az *in vitro* transzkripcióval előállított mRNS-ek nem viselnek 5’-sapkát, ami a transzlációjuk hatékonyságát jelentősen csökkentheti. Ezt a problémát kétféleképpen szoktuk orvosolni:

1. A transzkriptumot GTP-vel, S-adenozil-metioninnal és Vaccinia vírus „capping” enzimmel inkubálják.

2. Olyan vektorban történik a transzláció, amelyről a szintetizálódott mRNS 5’ végére egy rövid, ECMV vírus eredetű IRES (internal ribosome entry site) szekvencia kerül. Az IRES szekvencia jellegzetes másodlagos szerkezetet vesz fel, mely elősegíti a riboszóma betapadását az mRNS-re.

Ha **cDNS**-t használunk, azt többnyire **vektorba ültetve** adjuk a reakcióelegyhez. Többnyire a korábban már ismertetett, *in vitro* transzkripcióra kifejlesztett T7, T3, vagy SP6 bakteriofágok promóter-szekvenciáját is tartalmazó vektorokat használják (12-12.ábra). A transzlációnak kétfajta módja van: vagy a transzkripciós **reakció után**, a reakciótermékből kiindulva indítjuk a transzlációs reakciót (ez tulajdonképpen az előbb említett, RNS-templáttal működő transzlációt jelent, 12-13. ábra), vagy egy reakciócsőben, **párhuzamosan** történik a **transzkripció és a transzláció** (12-14. ábra). Ez utóbbi esetben többnyire **E. coli** baktériumsejt **lizátumát** használjuk, a megfelelő kiegészítőkkel (E. coli esetében kreatin-foszfát és kreatin-kináz helyett foszfoenol-piruvátot és piruvát-kináz enzimet használunk).

12-12. ábra

http://www.piercenet.com/guide/getting-started-vitro-protein-expression

2013.10.04.

12-13. ábra

http://www.lifetechnologies.com

2013.10.04.

Az E. coli sejtlizátum nagyon gazdag endogén mRNS-ekben is, ezért a sejtlizátumot preparációja során hosszabb ideig inkubálják, hogy ez az mRNS-háttér, és a róluk készült, rövid fél-életidejű fehérjék többsége degradálódjon. A gyors RNS-degradációs potenciál miatt ezt a rendszert szinte csak egyidejűleg történő *in vitro* transzkripcióra és transzlációra használjuk. (Néhány virális mRNS nagyobb rezisztenciát mutat az E. coli nukleázaival szemben, ezek átírásához használhatjuk a bakteriális sejtlizátumot.) Mivel az E. coli transzlációs apparátusa viszonylag egyszerű és kevésbé kontrollált, mint az eukarióta rendszerek, fehérjeszintetizáló képessége jóval hatékonyabb, ami lehetővé teszi nagyobb mennyiségű exogén fehérje termelődését.

12-14. ábra

http://www.lifetechnologies.com

2013.10.04.