

Kvasovke – tovarne rekombinantnih proteinov

Yeasts – factories for recombinant proteins

Mateja Novak Štagoj, Marjetka Podobnik

Povzetek Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, bolj poznana kot pekovska ali pivska kvasovka, že tisočletja igra pomembno vlogo pri pripravi hrane. Najbolje proučeni evkariotski mikroorganizem pa je zaradi svojih lastnosti tudi pomembno orodje za pridobivanje rekombinantnih proteinov. *S. cerevisiae* je primeren gostiteljski organizem za visoko produkcijo številnih proteinov: protiteles, hormonov, rastnih dejavnikov ter drugih farmacevtsko pomembnih makromolekul. Dobro poznavanje njene genetike in fiziologije omogoča uspešno načrtovanje vektorjev, posttranslacijskih modifikacij in visoko-produkcijskih gostiteljskih sevov.

Ključne besede: ekspresijski sistemi, rekombinantni proteini, kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, promotorji GAL, glikoinženiring.

Abstract Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, also known as a baker's or brewer's yeast, has played a considerable role in food production for several thousand years. The best characterized eukaryotic microorganism has several properties which have also established it as an important tool in expression of recombinant proteins. It is a suitable host organism for high level production of numerous proteins including hormones, growth factors, antibodies and other pharmaceutically important macromolecules. The well known genetics and physiology of yeast *S. cerevisiae* enable effective design of vectors, post-translational modifications and development of highly-productive host strains.

Key words: expression system, recombinant protein, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, GAL promoters, glycoengineering

1 Uvod

Rekombinantna tehnologija DNA je v 70-letih postavila prelomnico v razvoju moderne biotehnologije. Naše poznavanje zgradbe in delovanja DNA je v zadnjih 100 letih napredovalo nekako po stopnjah, vendar pa so nekatera odkritja imela prav poseben vpliv na razvoj sodobne biotehnologije. Odkritje, da DNA prenaša genske informacije ter razvoj genskih metod za manipulacije *in vitro* so omogočili izolacijo tarčnega gena iz določenega genetskega vira, vstavev v ustrezen ekspresijski vektor ter njegovo izražanje v primerem ekspresijskem sistemu, to je gostitelju, ki je namenjen biosintezi tarčnega proteina. Prvi rekombinantni protein, ki se je pred 25 leti pojavil na ameriškem tržišču, je bil inzulin, pridobljen v bakteriji *Escherichia coli* (1). Sledil je strm vzpon tovrstnih učinkovin v medicinski uporabi. Pripravki z rekombinantnimi učinkovinami so v preteklih letih tako predstavljali kar 10 % celotne svetovne prodaje farmacevtikov. Na tržišču je trenutno okrog 200 terapevtskih proteinov, v Evropski skupnosti jih je odobrenih okoli 90, dodatnih 500 pa jih je v fazi kliničnega preizkušanja (2).

2 Ekspresijski sistemi

Ekspresijski sistem oz. gostitelj heterologne DNA mora v kratkem času, s stabilnim produkcijskim procesom, ponovljivo proizvajati čim večje količine pravilno zvitega in aktivnega tarčnega proteina. Izbira ekspresijskega sistema je največkrat pogojena z značilnostmi in namenom uporabe rekombinantnega proteina (Preglednica 1). Pri biosintezi farmacevtskih proteinov sta predvsem pomembna

dejavnika, ki določata izbor ekspresijskega sistema, avtentičnost in varnost produkta, nasprotno pa je pri produkciji npr. industrijskih encimov pomembno, da rekombinantna tehnologija DNA omogoči hitro in ekonomično pridobivanje večjih količin želenega produkta (3). Produkcija farmacevtsko pomembnih rekombinantnih proteinov je zaenkrat omejena na bakterijo *E. coli*, navadno kvasovko *S. cerevisiae*, in na sesalske celice, medtem ko tehnične encime biosintetizirajo v bakterijah, kvasovkah in filamentoznih glivah. Za produkcijo velikih količin proteinov v industrijskem merilu večinoma uporabljamo mikroorganizme, zaradi njihove lažje manipulacije *in vitro*, enostavnega gojenja in ekonomičnosti proizvodnje.

Pomanjkljivosti in omejitve opisanih organizmov (odsotnost posttranslacijske mašinerije, nezmožnost tvorbe disulfidnih vezi, nepravilna in prekomerna glikozilacija), so zahtevali razvoj še drugih ekspresijskih sistemov, primernejših za izražanje kompleksnejših proteinov humanega izvora, kot so: rastlinske celice, celice insektov in sesalske celice. Kot alternativa celičnim ekspresijskim sistemom se v zadnjem času uveljavljajo tudi brezcelični ekspresijski sistemi. Transkripcija in translacija matrične DNA poteka *in vitro* največkrat avtomatizirano, v reakcijski mešanici, ki vsebuje potrebne substrate (tRNA, aminokisline, ATP...) in bakterijski ekstrakt z RNA polimerazo in ribosomi. Prednosti se kažejo predvsem pri biosintezi proteinov, ki se v celicah izražajo v netopni obliki, so občutljivi za razgradnjo z intracelularnimi proteazami, ali pa je njihova sinteza za celice toksična (5).

Preglednica 1. Primerjava značilnosti različnih ekspresijskih sistemov (4).
Table 1. Characteristics comparision of different expression system (4).

Značilnosti	Bakterije (<i>E. coli</i>)	Kvasovke (<i>S. cerevisiae</i>)	Insektne celice	Sesalske celice
Hitrost rasti	Hitra (30 min)	Hitra (90 min)	Počasna (18-24 h)	Počasna (24 h)
Rastno gojišče	Enostavno	Enostavno	Kompleksno	Kompleksno
Cena rastnega gojišča	↓	↓	↑	↑
Prisotnost retrovirusov	✗	✗	✗	Možni
Prisotnost pirogenov	Možni	Ne	Ne	Ne
Stopnja izražanja proteina	↑	↑	↓ do ↑	↓
Molekulska masa proteina	↓	↑	↑	↑
Zunajcelično izražanje	Izločanje v periplazmo	Izločanje v gojišče	Izločanje v gojišče	Izločanje v gojišče
Zvitje proteina	Pogosto neustrezno	Večinoma pravilno	Pravilno	Pravilno
Tvorba S-S mostičkov	Omejena	Ni omejitev	Ni omejitev	Ni omejitev
Agregacija	Tvorba inkluzijskih teles	Posamezen protein, nativna oblika	Posamezen protein, nativna oblika	Posamezen protein, nativna oblika
N-glikozilacija	✗	Visoko manozna	Preprosta, brez sialične kisline	Kompleksna, večinoma ustrezna
O-glikozilacija	✗	✓	✓	✓
Fosforilacija	✗	✓	✓	✓
Acetilacija	✗	✓	✓	✓
Acilacija	✗	✓	✓	✓
γ-karboksilacija	✗	✗	✗	✓

Legenda: ✓ Je ✗ Ni ↑ Visoka ↓ Nizka

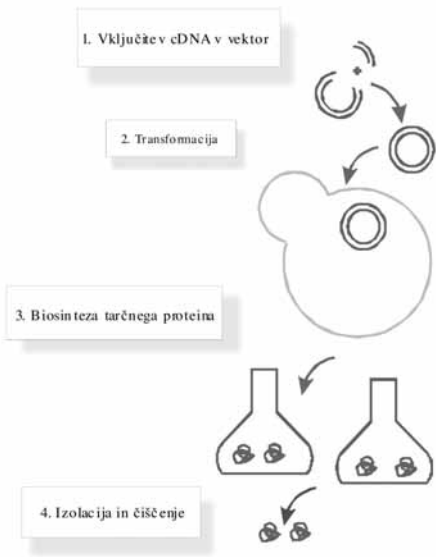
3 Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasovke so enocelični organizmi in spadajo med najenostavnejše evkarionte. Tako kot višji evkarionti imajo podobno osnovno subcelularno organizacijo s prisotnim jedrom, mitohondriji, endoplazmatskim retikulumom, golgijevim aparatom, sekretornimi vezikli, vakuolami in mikrotelesi. Pekovska kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* med kvasovkami zasluži posebno mesto, saj je njena uporaba v prehranske namene skoraj tako dolga kot naša civilizacija. Prednost *S. cerevisiae* je še v tem, da ima status GRAS (Generally Regarded As Safe) in za večino genskih manipulacij ni etično sporna. Dobro poznavanje njenih molekularnih in biokemijskih lastnosti je omogočilo razvoj specifičnih, tako klasičnih kot rekombinantnih genskih tehnik. Prvi evkariontski klonirni in ekspresijski vektorji so bili razviti prav za *S. cerevisiae* (6). Na njihovi osnovi se je že v zgodnjih 80-ih letih razvila proizvodnja številnih, zlasti farmacevtsko zanimivih rekombinantnih proteinov v industrijskem merilu (Preglednica 2).

Kvasovke kot gostiteljski sistem so primerni za intracelularno in ekstracelularno izražanje genov različnega izvora (humanega, živalskega, rastlinskega ali virusnega). Izražanje tujih genov vključuje več korakov (Slika 1):

1. Vključitev tuje kodirajoče sekvence DNA (cDNA) v primerno ekspresijsko kaseto (vektor), ki vsebuje kvasni promotor in terminator.
2. Transformacija oz. vnos vektorja v ustrezen gostiteljski sev ter stabilno vzdrževanje le-tega v celicah.

3. Sinteza heterolognega proteina pri specifičnih, točno določenih pogojih gojenja.
4. Izolacija in čiščenje tarčnega proteina.



Slika 1: Oris tipičnega postopka produkcije heterolognega (tujega) proteina.

Figure 1: Description of typical procedure for heterologous (foreign) protein production.

Preglednica 2. Terapevtski proteini, ki jih proizvajajo v kvasovkah *S. cerevisiae* in *P. pastoris* (2).

Table 2. Therapeutic proteins produced in yeasts *S. cerevisiae* and *P. pastoris* (2).

Rekombinantni pripravki na tržišču

Pripravek	Rekombinantni protein	Proizvajalec	Ekspresijski sistem
Actrapid	inzulin	NovoNordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Ambrix	hepatitis B antigen	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Comvax	hepatitis B antigen	Merck	<i>S. cerevisiae</i>
Elitex	uratna oksidaza	Sanofi-Synthelabo	<i>S. cerevisiae</i>
Glucagen	glukagon	Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>
HBVAXPRO	hepatitis B antigen	Aventis Pharma	<i>S. cerevisiae</i>
Hexavac	hepatitis B antigen	Aventis Pasteur	<i>S. cerevisiae</i>
Infarinx-Penta	hepatitis B antigen	GlaxoSmitKline	<i>S. cerevisiae</i>
Leukine	granulocyte-makrofage stimulirajoči dejavnik	Berlex	<i>S. cerevisiae</i>
Novolog	inzulin	Novo Nordix	<i>S. cerevisiae</i>
Pediatrix	hepatitis B antigen	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Procomvax	hepatitis B antigen	Aventis Pasteur	<i>S. cerevisiae</i>
Refuldan	hirudin/lepirudin	Hoechst	<i>S. cerevisiae</i>
Regranex rh	trombocitni rastni dejavnik	Ortho-McNeil Pharma (ZDA), Janssen-Cilag (EU)	<i>S. cerevisiae</i>
Revasc	hirudin/desirudin	Aventis	<i>S. cerevisiae</i>
Twinrix	hepatitis B antigen	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>

Pripravki v razvoju

Protein	Indikacija	Proizvajalec	Ekspresijski sistem
Angiostatin	Antiangiogenški dejavnik	EntreMed	<i>P. pastoris</i>
Elastazni inhibitor	Cistična fibroza	Dyax	<i>P. pastoris</i>
Endostatin	Antiangiogenški dejavnik	EntreMed	<i>P. pastoris</i>
Analog epidermalnega rastnega dejavnika	Diabetes	Transition therapeutics	<i>P. pastoris</i>
Inzulinu podoben rastni dejavnik-1	Pomanjkanje le tega	Cephalon	<i>P. pastoris</i>
Humani serumski albumin	Stabilizacija volumna krvi pri opeklinah/šoku	Welfide	<i>P. pastoris</i>
Inhibitor kalikreina	Prirojen angioedem	Dyax	<i>P. pastoris</i>

S. cerevisiae združuje lastnosti prokariotov kot so hitra rast v enostavnih in poceni gojiščih, enostavna genska manipulacija ter sposobnosti višjih evkariontov - zmožnosti specifičnih posttranslacijskih modifikacij: proteolitskega procesiranja, zvijanja proteinov, tvorbe disulfidnih vezi in glikozilacije. V primerjavi z bolj kompleksnimi evkariontskimi ekspresijskimi sistemi (celice CHO) je gojenje manj zahtevno, produkcija je hitra in ponavadi daje višji dobiček (3, 7). Poleg številnih prednosti pa ima uporaba *S. cerevisiae* tudi nekaj pomankljivosti kot so: nezmožnost rasti do visokih gostot, neučinkovito izražanje v gojišče, prekomerna in nepravilna glikozilacija.

bilo kar nekaj alternativnih kvasnih ekspresijskih gostiteljev kot so: *Pichia pastoris* (8) in *Hansenula polymorpha* (9), *Yarrowia lypolytica* (10), *Kluyveromyces lactis* (11), *Schizosaccharomyces pombe* (12). Zaradi večje zmogljivosti sinteze in izločanja heterolognih proteinov, se je za produkcijo v industrijskem merilu najbolj uveljavila metilotrofna kvasovka *P. pastoris* (Preglednica 2). Njene najpomembnejše prednosti so: rast do visokih gostot celične biomase na poceni gojišču, stabilna vključitev gena za zeleni protein v genom, inducibilno uravnavanje izražanja pod močnim, natančno uravnavanim promotorjem za alkoholno oksidazo in enostaven prenos v večje merilo, brez izgube dobitka.

4 *Pichia pastoris* in druge ne-konvencionalne kvasovke

Pomanjkljivosti in nekatere omejitve pri uporabi *S. cerevisiae* so spodbudile raziskovalce k odkrivanju naravnih potencialov drugih kvasovk in večjih možnosti njihove genske manipulacije. Razvitih je

5 Pristopi za izboljšanje produkcije rekombinantnih proteinov

Raven biosinteze tarčnega proteina v veliki meri določajo lastnosti, ki so lastne izraženemu proteinu. Vendar pa lahko izkoristek precej

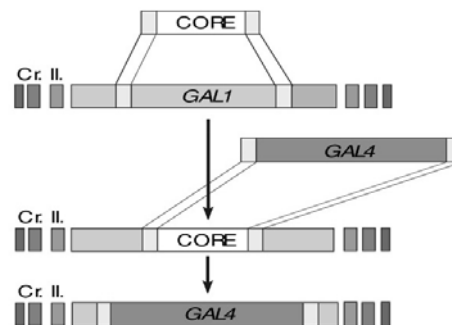
izboljšamo z upoštevanjem različnih dejavnikov, ki vplivajo na izražanje genov ter stabilnost produkta. Vključitev heterolognega gena v ekspresijski vektor še ni zadosten pogoj za njegovo dobro izražanje. Izražanje genov je kompleksen večstopenjski proces in problemi lahko nastopijo v vseh stopnjah, od transkripcije do stabilnosti proteina. Z razvojem molekularne genetike kvasovk se je močno povečalo razumevanje teh procesov. Na voljo imamo številne optimizirane vektorje, rekombinantne visoko-produkcijske gostiteljske seve ter nova genska orodja in rešitve, ki pripomorejo k izboljšanju izkoristka biosinteze pravilno zviti in biološko aktivnih proteinov. V prispevku smo se omejili na specifične pristope, ki izboljšajo sintezo genskih produktov na ravni transkripcije, in na tiste, ki omogočajo produkcijo biološko aktivnih, pravilno glikoziliranih proteinov.

5.1. Inženiring galaktoznega sistema

Za učinkovito izražanje tujih genov v kvasovkah so potrebni homologni promotorji, to so lastna zaporedja, ki uravnavajo izražanje genov. Njihova pravilna izbira predstavlja kritično odločitev, še zlasti če želimo proizvodnjo prenesti v večjo merilo. Promotorji kvasovke vsebujejo vsaj tri elemente, ki uravnavajo učinkovitost in natančnost začetka prepisa: aktivacijsko zaporedje UAS, element TATA in iniciacijski element. Številni vsebujejo tudi elemente, ki zavirajo transkripcijo. Večina promotorjev je le delno uravnanih. Najmočnejši, glikolitični promotorji so slabo uravnani, kar zmanjšuje njihovo uporabnost. Kljub temu imamo na voljo še številne druge; med najbolj preučene v *S. cerevisiae* sodijo promotorske sekvence genov *GAL1*, *GAL7* in *GAL10*, katerih proteinski produkti sodelujejo pri metabolizmu galaktoze. Galaktozni promotorji oz. t.i. promotorji *GAL* so pomembni za načrtovanje in konstrukcijo vektorjev, saj omogočajo visoko produkcijo. Znani sta dve ključni prednosti uporabe tovrstnih promotorjev. Prvič, možnost gojenja celic v gojišču, kjer je aktivnost teh promotorjev skoraj popolnoma zavirana, kar omogoča gojenje do primerne gostote celic (biomase) in sosledno indukcijo. S tem je omogočena tudi produkcija proteinov, katerih visoka raven močno spremeni metabolizem in fiziologijo gostiteljske celice ter proteinov, ki so potencialno toksični za kvasno celico. Ter drugič, ti promotorji spadajo med najmočnejše v *S. cerevisiae*. Izražanje galaktoznih genov je namreč natančno uravnano: v prisotnosti induktorja - galaktoze se izražanje teh genov močno poveča, tudi do 1000-krat, medtem ko glukoza močno zavira njihovo izražanje (6, 13, 14).

Znano je, da so neposredno ali posredno v uravnavanje sistema *GAL* vključeni številni geni oz. njihovi produkti (15-18). Pozitivni regulator je transkripcijski dejavnik Gal4p, ki se veže na promotorska zaporedja teh genov. Negativni regulator Gal80p v prisotnosti glukoze, z vezavo na Gal4p, preprečuje indukcijo. *GAL4* se v celici izraža v zelo nizki količini (le ena do dve molekuli). Za optimalno indukcijo promotorjev *GAL* pa je nujno potrebna zadostna raven proteina Gal4p v celici. To je posebej pomembno za produkcijo heterolognih proteinov, ki se izražajo iz plazmidov, ki so v celici prisotni v večjih kopijah ("multi-copy" plazmidi).

V strokovni literaturi zasledimo več poskusov genskega inženiringa galaktoznega sistema z namenom optimizacije produkcije rekombinantnih proteinov. Ker je transkripcijski dejavnik Gal4p prisoten v celici v zelo nizki količini in zato omejuje indukcijo genov *GAL*, so raziskovalci poskusili premestiti to težavo. Rešitev vsekakor ni v konstitutivnem prekomernem izražanju *GAL4*, kajti posledica tega je



Slika 2: Odprti bralni okvir gena *GAL1* smo v prvi fazi zamenjali s selekcijsko kaseto *CORE*, ki smo jo nato v drugi fazi popolnoma odstranili z odprtim bralnim okvirjem gena *GAL4*.

Figure 2: The open reading frame of *GAL1* gene was in the first phase replaced by the *CORE* selection cassette, that was in the second phase completely removed by the *GAL4* open reading frame.

izguba regulacije. Leta 1984 je Laughon s sodelavci opisal transformirane kvasne seve, ki vsebujejo "multi-copy" plazmide s strukturnim genom *GAL4* pod nadzorom promotorja *GAL1* (19). V literaturi in v patentnem varstvu je opisana integracija ekspresijske kasete *GAL10p-GAL4* v kromosomski lokus *HIS3*. V prisotnosti galaktoze so opazili 3-kratno povečanje produkcije tarčnega proteina (20).

Uporabo produkcijskih sevov, ki imajo mutiran gen *GAL1*, je utemeljil že Hovland s sodelavci, leta 1989 (21), in kasneje še številni drugi. Gen *GAL1* kodira encim galaktokinaza, ki fosforilira galaktozo v galaktozo-1-P. Ugotovili so, da se pri mutiranih sevih (*gal1*), ki niso sposobni induktorja metabolno pretvarjati, izražanje tarčnih genov, ki so pod nadzorom promotorjev *GAL*, značilno poveča. V sevih *gal1* ostaja raven galaktoze v fermentacijskih gojiščih nespremenjena, kar omogoča in zagotavlja stalno ter konstantno indukcijo promotorjev *GAL*.

Raziskovalci iz Laboratorija za biosintezo in biotransformacijo na Kemijskem inštitutu smo skonstruirali nov sev kvasovke *S. cerevisiae*, v katerem smo lokus gena *GAL1* s homologno rekombinacijo zamenjali z genom za transkripcijski aktivator Gal4p. *GAL*-rekombinantni sev vsebuje poleg konstitutivno izražajočega gena *GAL4* še dodatno kopijo gena *GAL4*, ki se izraža pod nadzorom promotorja *GAL1* (Slika 2). Opisana zamenjava genov *GAL* v genomu kvasovke je povzročila bistveno izboljšanje sinteze poročevalske molekule, zeleno-fluorescirajočega proteina (GFP). *GAL*-rekombinantni sev zatorej lahko uporabimo za visoko izražanje heterolognih genov, ki so uravnani z galaktozo - inducibilnimi promotorji (22).

5.2. Glikozilacija proteinov in glikoinženiring

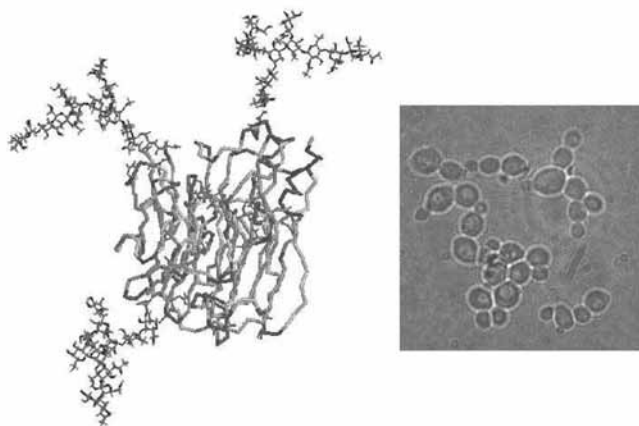
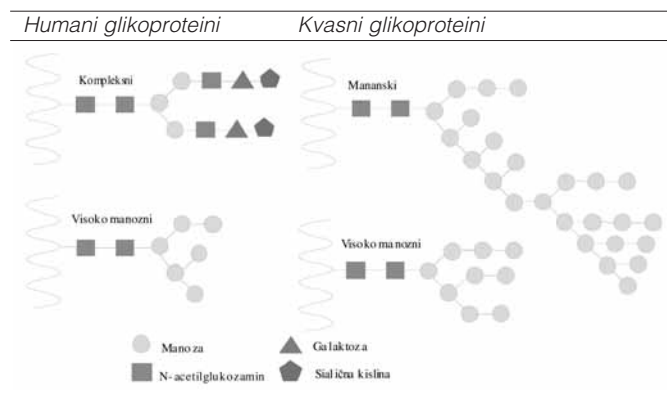
Terapevtske proteine lahko v grobem razdelimo v tiste, ki niso posttranslacijsko modificirani, in v tiste, ki za svojo biološko aktivnost

potrebujejo posttranslacijsko procesiranje. Glikozilacija je najbolj pogosta in hkrati najbolj kompleksna posttranslacijska modifikacija proteinov. Ugotavljajo, da je vedno več fiziološko pomembnih molekul glikoproteinov, to je proteinov s kovalentno vezanimi ogljikovimi hidrati (Slika 4). Ti proteini sodelujejo pri mnogih bioloških procesih, npr. prepoznavanju med celicami, imunskem odgovoru in strjevanju krvi. Čeprav je vloga mnogih glikoproteinov znana, pa pomen oligosaharidnih enot, ki so pripete na protein, ni vedno razjasnjen (23).

Neglikozilirane proteine večinoma proizvajajo v *E. coli* in *S. cerevisiae*, in ti trenutno predstavljajo 40 % vseh terapevtskih proteinov. Nekatere neglikozilirane proteine pridobivajo iz obeh ekspresijskih sistemov, kot na primer inzulin, ki ga proizvajajo v *E. coli* (Humulin) in v kvasovki (Novolog). Prokariotski gostitelji, kot je *E. coli*, proteinov ne glikozilirajo, nižji evkarionti, kot so kvasovke ter insektne celice, pa izkazujejo drugačen vzorec glikozilacije. Le malo nativno glikoziliranih proteinov proizvajajo v neglikozilirajočih gostiteljih (interferon β -1b), kajti odsotnost glikozilacije lahko vpliva na razpolovni čas in druge, klinično pomembne lastnosti molekule. Neglikozilirane oblike glikoproteinov so ponavadi nepravilne zvite, biološko neaktivne in se hitro izločijo iz krvnega obtoka (24).

Kvasovka *S. cerevisiae* že v osnovi procesira oligosaharide na drugačen način kot višji evkarionti. Ogljikove hidrate, vezane na proteine, pri človeku sestavljajo predvsem monosaharidi manoza, galaktoza, fukoza, N-acetilgalaktozamin, N-acetilglukozamin, sialična kislina in glukoza. Ti monosaharidi sestavljajo kompleksen razvejan vzorec, v katerem je običajno manj kot 15 monosaharidnih molekul. Pri kvasovki je pripetih monosaharidov bistveno več, tudi do več 100 in so pretežno sestavljeni iz manoze (Preglednica 3) (25, 26). Heterologni proteini, ki jih pridobivamo iz kvasovk, so tako pogosto premočno glikozilirani oz. hipermanozilirani. Takšne oblike pa imajo visoko afiniteto do manoznih receptorjev, ki so prisotni na makrofagih in endotelijskih celicah. Posledica je krajši razpolovni čas, nižja učinkovitost terapevtskega glikoproteina ter, kar je najhujše, nepravilno in napačno vezani sladkorji lahko izzovejo nevarno imunsko reakcijo (3). Za proizvodnjo kompleksnih glikoproteinov, ki trenutno predstavljajo 60 % vseh terapevtskih proteinov, se zato uporabljajo sesalske celice, predvsem ovarijske celice kitajskega

Preglednica 3. Glikozilacijski vzorec pri človeku in pri kvasovkah.
Table 3. Glycosylation pattern in human and yeast.



Slika 3: Večina človeških proteinov obdaja 'ogrodje sladkorjev'. Gensko spremenjene kvasovke dodajajo sladkorje pravilno.

Figure 3: Most human proteins are surrounded by 'scaffold of sugar'. Engineered yeast can now make the correct attachments.

hrčka (CHO). Te so sposobne glikozilirati tarčne proteine s humanim vzorcem, kljub temu pa se nekatere glikanske strukture, proizvedene v CHO, razlikujejo od humanih in so zato potrebne za učinkovitost dodatne *in vitro* modifikacije (24).

Zaradi zahtevnosti pridobivanja terapevtskih proteinov v sesalskih celičnih linijah in posledično neekonomičnosti, so raziskovalci z genskim inženirstvom poskušali humanizirati glikozilacijsko pot v kvasovki *P. pastoris*. Poskusi so bili usmerjeni v izbitje genov glikozilacijskih encimov, ki sodelujejo v procesu hipermanozilacije, in vnos genov, ki kodirajo encime, pomembne za sintezo, prenos in dodajanje humanih oligosaharidov. Začetni poskusi so bili neuspešni, ker heterologni encimi niso prispeli na mesto delovanja, to je v Golgijev aparat (27, 28). Nedavno pa so Gerngross in sodelavci predstavili skupino mutiranih sevov *P. pastoris*, ki specifično in pravilno glikozilirajo tarčne proteine. Glavna prednost gensko spremenjenih kvasovk je v homolognem pripenjanju oligosaharidov (29, 30). Načrtovana in natančno nadzorovana glikozilacija pa je ključna za izboljšanje klinično pomembnih lastnosti terapevtskih makromolekul.

6 Sklep

Idealnega ekspresijskega sistema ni, zato je potrebno pri izbiri sistema za biosintezo tarčnega proteina vedno narediti kompromis in izbrati tistega, ki najbolj ustreza našim zahtevam. Šestino vseh, na tržišču odobrenih terapevtskih proteinov pridobivajo z biosintezo v kvasovki *S. cerevisiae*. Čeprav obstajajo številne omejitve pri uporabi te kvasovke kot gostitelja heterolognih genov, pa je prednost uporabe prav v tem, da so mnogi problemi znani, da obstajajo genska in biokemijska orodja in cela vrsta mutiranih sevov, s katerimi lahko nekatere izmed problemov odstranimo ali pa vsaj omejimo. Prednost kvasovk, v primerjavi s kompleksnejšimi gostitelji kot so sesalske celice, torej ostaja v tem, da so preprostejše, enostavnejše, njihovo gojenje je cenejše in poznavanje boljše.

7 Literatura

1. Villa-Komaroff L, Broome S, Naber SP et al. The synthesis of insulin in bacteria: a model for the production of medically useful proteins in prokaryotic cells. *Birth Defect Orig Artic Ser* 1980; 16: 53-68.
2. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks--2003. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 865-870.
3. Eckart MR, Bussineau CM. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7: 525-530.
4. Fernandez JM and Hoeffler JP. Comparison of expression systems. Fernandez JM and Hoeffler JP. *Gene Expression Systems. Using nature for the art of expression.* 14-11-2000. Academic Press. 15-12-2003.
5. The Basics: In Vitro Translation. Ambion, Inc. 5-12-2003. 10-12-2003.
6. Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 1992; 8: 423-488.
7. Sudbery PE. The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7: 517-524.
8. Sreekrishna K, Potenz RH, Cruze JA et al. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol* 1988; 28: 265-278.
9. Sudbery PE, Gleeson MA, Veale RA et al. *Hansenula polymorpha* as a novel yeast system for the expression of heterologous genes. *Biochem Soc Trans* 1988; 16: 1081-1083.
10. Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 2004; 109: 63-81.
11. Swinkels BW, van Ooyen AJ, Bonekamp FJ. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993; 64: 187-201.
12. Giga H, Kumagai H. Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 30 (3): 235-244.
13. Douglas HC, Hawthorne DC. Enzymatic expression and genetic linkage of genes controlling galactose utilization in *Saccharomyces*. *Genetics* 1964; 49: 837-844.
14. Johnston M. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 1987; 51: 458-476.
15. Ren B, Robert F, Wyrick JJ et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 2000; 290: 2306-2309.
16. Cornish-Bowden A, Cardenas ML. Complex networks of interactions connect genes to phenotypes. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 463-465.
17. Giaever G, Chu AM, Ni L et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 2002; 418: 387-391.
18. Štagoj NM, Comino A, Komel R. Fluorescence based assay of GAL system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 244: 105-110.
19. Laughon A, Gesteland RF. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 260-267.
20. Schultz LD, Hofmann KJ, Mylin LM et al. Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. *Gene* 1987; 61: 123-133.
21. Hovland P, Flick J, Johnston M et al. Galactose as a gratuitous inducer of GAL gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene* 1989; 83: 57-64.
22. Štagoj NM, Comino A, Komel R. A novel GAL recombinant yeast strain for enhanced protein production. *Biomol Engineering* 2006; 23: 195-199.
23. Elliott S, Lorenzini T, Asher S et al. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 414-421.
24. Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1409-1414.
25. Silberstein S, Gilmore R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J* 1996; 10: 849-858.
26. Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1426: 227-237.
27. Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2003; 100: 5022-5027.
28. Callewaert N, Laroy W, Cadiogi H et al. Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1,2- α -D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* 2001; 503: 173-178.
29. Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B et al. Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* 2003; 301: 1244-1246.
30. Wildt S, Gerngross TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 119-128.