

# Ekspresja heterologicznych genów w *Saccharomyces cerevisiae*

Jolanta Topczewska

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Warszawa

## 1. Wstęp

Postęp jaki dokonał się w poznaniu i zrozumieniu biologii molekularnej i genetyki drożdży *S. cerevisiae* pozwolił na wykorzystanie tych organizmów w ciągu lat osiemdziesiątych do produkcji heterologicznych białek. Szczególnie konstrukcje różnego typu wektorów oraz poznanie nowych elementów genetycznych kontrolujących transkrypcję DNA, zwłaszcza silnych, konstytutywnych i ściśle regulowanych promotorów (40), umożliwiło wykorzystanie drożdży, jako taniego i łatwego w hodowli mikrobiologicznego producenta białek ssaków. Jednym z pierwszych było zastosowanie drożdży do produkcji szczepionki przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Produkcja tej szczepionki oparta została na wewnątrzkomórkowej syntezie antygeny powierzchniowego wirusa (52). Antygen ten należy do klasy białek szczególnie nadających się do produkcji w drożdżach, gdyż dla komórki bakteryjnej *Escherichia coli* hydrofobowe, błonowe białka, lub wirusowe glikoproteidy mogą być silnie toksyczne i synteza ich przebiega z bardzo niską wydajnością albo nie zachodzi w ogóle (10).

Zjawisko wydzielania przez drożdże niektórych własnych białek na zewnątrz komórki zostało wykorzystane w biotechnologii do sekrecji białek heterologicznych do podłoża hodowlanego. Przejście przez poszczególne etapy drogi sekrecyjnej umożliwia wytworzenie właściwej konformacji nawet bardzo złożonego peptydu, jednakże sekrecja może również ograniczać produkcję obcego białka (34).

## 2. Wektory drożdżowe

Podstawowym warunkiem uzyskania wydajnej produkcji obcych białek przez *S. cerevisiae* jest wybór odpowiedniego wektora ekspresyjnego. Istnieją dwa zasadnicze typy wektorów służących do produkcji i analizy heterologicznych białek w drożdżach. Są to tzw. konstytutywne wektory ekspresyjne, w których heterologiczny gen ulega stałej ekspresji oraz wektory regulowane, w których ekspresja genu zachodzi w odpowiedzi na zdefiniowane sygnały



środowiskowe. Używając tych podstawowych wektorów można produkować białko wewnątrz komórki drożdżowej lub wyprowadzać je na zewnątrz dzięki włączeniu w wektor sekwencji kodującej peptyd wyprowadzający.

Każdy wektor służący do wydajnej ekspresji genów zawiera następujące elementy:

— fragmenty bakteryjnego DNA umożliwiające inicjację replikacji plazmidu w *E. coli* (ori ColE1) oraz gen  $\beta$ -laktamazy warunkujący selekcję i manipulacje genetyczne w bakteriach tzn. namnażanie i izolację wektora,

— sekwencje drożdżowego DNA umożliwiające autonomiczną replikację wektora w komórce drożdżowej oraz marker selekcyjny czyli gen służący do selekcji komórek niosących plazmid,

— kasetę ekspresyjną, która składa się z promotora, miejsc restrykcyjnych służących do klonowania genu oraz terminatora transkrypcji.

Jeśli produkt klonowanego genu ma być wydzielany na zewnątrz komórki to w kasecie ekspresyjnej, za promotorem powinien znajdować się fragment DNA kodujący peptyd wyprowadzający z inicjującym translację kodonem ATG. Klonowany gen musi być wtedy włączony w ramkę odczytu peptydu wyprowadzającego. Podczas przechodzenia powstałego polipeptydu przez retikulum endoplazmatyczne, na jednym ze wstępnych etapów drogi sekrecyjnej, następuje odcięcie peptydu wyprowadzającego.

### 3. Promotory

Sygnaly kontrolujące wydajną inicjację (promotor) i terminację syntezy mRNA heterologicznego genu, są jednymi z ważniejszych elementów wektora. W większości dotychczas opisanych przypadków wprowadzane obce geny ulegają ekspresji pod kontrolą oryginalnych drożdżowych sekwencji promotorowych. Podstawowym kryterium wyboru promotora jest jego siła (mierzona liczbą zainicjowanych transkryptów w jednostce czasu) i możliwość jego regulacji. W opublikowanych pracach często stosuje się promotory następujących genów: dehydrogenazy alkoholowej (ADH) (23), kinazy fosfoglicerynowej (PGK) (51), kwaśnej fosfatazy (PHO5) (36), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAP) (4), galaktokinazy (GAL1) (21) oraz czynnika płciowego  $\alpha$  (MF $\alpha$ ) (6). Promotory te pozwalają na wydajną transkrypcję heterologicznych genów jednak ze zróżnicowaną wydajnością. Wynika to z obecności sekwencji liderowych nie podlegających translacji, zdolności drożdży do wykorzystywania kodonów heterologicznego genu lub stabilności samego białka. W konsekwencji ilość uzyskiwanego białka może być różna.

Klasyyczna drożdżowa sekwencja promotorowa zawiera jedno lub więcej (44) miejsc startu transkrypcji DNA, element TATA *box* oraz sekwencje regulatorowe. W drożdżach istnieją trzy typy sekwencji regulatorowych: UAS (*upstream activator sequences*), URS (*upstream represor sequences*) oraz konstytutywny element promotorowy, które występują między 20 – 500 nukleotydem poprzedzając sekwencję TATA. Transkrypcja wielu genów drożdżowych może



być indukowana lub represjonowana zgodnie z fizjologicznym stanem komórki. Elementy UAS i URS rozpoznają specyficzne białka regulatorowe. UAS został po raz pierwszy wykryty w promotorach CYC1 i HIS3 (22). Obecność tego elementu, który pod wieloma względami przypomina obecny u wyższych *Eukariota* „enhancer”, w kasecie ekspresyjnej, może podnieść poziom ekspresji heterologicznego genu.

Komórki produkujące obce białko są szczególnie obciążone metabolicznie, gdy kodujący je gen jest pod kontrolą silnego, konstytutywnego promotora (np. promotor GAP), a także gdy produkt heterologicznego genu jest toksyczny dla komórki. Stosowane są wówczas precyzyjnie regulowane promotory, których transkrypcję indukuje się dopiero wówczas, gdy hodowla komórek drożdżowych osiąga wysoką gęstość, zazwyczaj w późnej fazie logarytmicznej.

Regulacja niektórych promotorów odbywa się przez katabolną represję. Należy do nich intensywnie badany od 1981 r. (13) i obecnie wprowadzony do przemysłowego stosowania promotor ADH2. Zawiera on dwa elementy UAS. Promotor ADH2 jest wydajnie derepresjonowany poprzez usunięcie z podłoża glukozy. Przynajmniej 3 koncerny biotechnologiczne: Chiron, Immunex i Nordish Gentofte stosują ADH2 promotor lub jego elementy ADH2 UAS połączone z innymi promotorami do komercyjnej produkcji heterologicznych białek. Na przykład ludzka proinsulina była produkowana z wydajnością  $100 \text{ mg l}^{-1}$  jako hybrydowe białko z ludzką dysmutazą ponadtlenkową pod kontrolą hybrydowego promotora ADH2-GAPDH (12). Ten sam promotor został wykorzystany do produkcji wzrostowego czynnika fibroblastów ludzkich i bydłych (FGF) (2).

Regulacja ekspresji genów przez represję ich transkrypcji jest ważnym elementem mechanizmu kontrolującego wyrażanie się genów zaangażowanych w typ płciowy komórki drożdżowej. Proces ten jest bardzo złożony i został opisany przez Walton & Yarranton (54). Po raz pierwszy system ten został wykorzystany do produkcji heterologicznego białka przez Brake'a (7) i Śledziwski i in. (50) w temperaturowo wrażliwych mutantach *S. cerevisiae* typu  $\text{sir3}^{\text{ts}}$ . Ekspresję obcego genu w tych szczepach indukuje się poprzez obniżenie temperatury hodowli. W doświadczeniach wykorzystano promotor  $\text{MAT}\alpha 2$  (50) lub promotor genu kodującego czynnik płciowy  $\alpha 1$  ( $\text{MF}\alpha 1$ ) (7). Czynniki płciowe  $\alpha$  powoduje zatrzymanie komórek typu płciowego, a w fazie G1 cyklu komórkowego, co umożliwia synchronizację przygotowujących się do koniugacji obu typów komórek drożdżowych (7). Oba promotory są aktywne w haploidalnych komórkach odpowiedniego typu płciowego, ale nie w  $a/\alpha$  diploidach. Mutacja  $\text{sir3}$  powoduje, że w temperaturze restrykcyjnej ( $35^\circ\text{C}$ ) z locus  $\text{HML}\alpha$  na chromosomie zachodzi synteza represora, który oddziałując z operatorem  $\text{MAT}\alpha 2$  powoduje zablokowanie transkrypcji genu. Natomiast w temperaturze permissywnej w  $25^\circ\text{C}$  produkt genu  $\text{sir3}^{\text{ts}}$  powoduje zahamowanie tworzenia represora z locus  $\text{HML}\alpha$ , a zatem z promotora  $\text{MAT}\alpha 2$  lub promotora genu  $\text{MF}\alpha 1$  odbywa się transkrypcja klonowanego genu. Promotora  $\text{MF}\alpha 1$  użyto do produkcji ludzkiego epidermalnego czynnika wzrostowego, hEGF, w szczepie *S. cerevisiae*  $\text{Mata}, \text{sir3-8}^{\text{ts}}$ . W przypadku hodowli, która



osiągnęła odpowiednią biomasę, przeniesienie z temperatury 35°C do 25°C, powodowało indukcję produkcji białka hEGF w ciągu kilku godzin do poziomu 4 mg l<sup>-1</sup>. Odpowiada to 400-krotnej indukcji ekspresji genu hEGF (gdyż w temperaturze restrykcyjnej poziom hEGF oznaczono jako 10 ng l<sup>-1</sup>). Ten rodzaj regulacji syntezy heterologicznego białka jest wygodny w skali laboratoryjnej, natomiast obniżenie temperatury w fermentorze przemysłowym jest utrudnione.

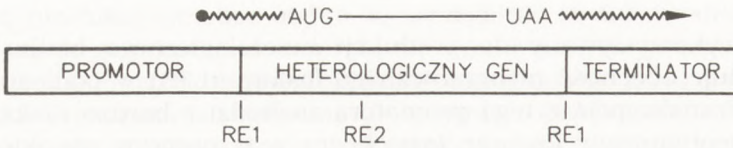
Często wykorzystywany do produkcji heterologicznego białka promotor PHO5 reguluje obecność nieorganicznego fosforanu (P<sub>i</sub>) w podłożu hodowlanym (45). Transkrypcja z tego promotora zachodzi z bardzo niską wydajnością, gdy nieorganiczny fosforan jest obecny w pożywce w wysokim stężeniu (ten system nie wyłącza się całkowicie) i jest maksymalna, gdy brak P<sub>i</sub> w podłożu. Indukcja ekspresji heterologicznego genu może nastąpić przez zmianę składu podłoża hodowlanego. Natomiast w skali laboratoryjnej wygodniejszym czynnikiem regulującym transkrypcję z tego promotora jest temperatura. Kramer i in. (31) wyizolowali klasę mutantów *S. cerevisiae* w genach regulatorowych kwaśnej fosfatazy, w których obniżenie temperatury z 35° do 24°C powoduje włączenie transkrypcji z tego promotora. W szczepie *S. cerevisiae* pho80, pho4<sup>ts</sup> w którym produkowano ludzki IFN-α1 pod kontrolą promotora PHO5, obniżenie temperatury indukowało 50-krotnie ekspresję odpowiedniego genu. Również silne glikolityczne promotory często są stosowane w wektorach ekspresyjnych. Promotory GAL1 lub GAL10 są regulowane przez obecność galaktozy w podłożu hodowlanym, która indukuje transkrypcję. Na poziom transkrypcji wpływa ponadto pozytywny regulator, produkt genu GAL4. Potencjalny poziom indukcji z tych promotorów jest bardzo wysoki, jednak synteza heterologicznych białek pod kontrolą promotora GAL1 nie zawsze jest bardzo wydajna (48, 21). Ostatnio często stosuje się hybrydowe promotory (5), np. sekwencje regulatorowe pochodzące z GAL1-GAL10 połączone z promotorem GPD. Ten promotor indukuje się glaktozą, natomiast poziom ekspresji genów znajdujących się pod jego kontrolą jest porównywalny z niemodyfikowanym promotorem GPD.

Sekwencje nukleotydowe determinujące terminację transkrypcji i/lub poliadenylacji (zapewniające optymalną akumulację mRNA) nie muszą pochodzić z drożdży. Dotychczas nie wykazano ilościowego wpływu różnych sekwencji terminujących transkrypcję DNA na wydajność ekspresji heterologicznego białka (4).

Sekwencje promotorowe nie zawierają kodonu inicjującego translację ATG, który z tego względu musi znajdować się w klonowanym genie lub, w przypadku wektora sekrecyjnego, rozpoczyna on sekwencję kodującą peptyd wyprowadzający. W drożdżach, w przeciwieństwie do bakterii i wyższych *Eukariota*, inicjacja translacji nie zależy od ścisłego kontekstu sekwencji nukleotydowej. Odległość pomiędzy sekwencją TATA a miejscem startu translacji jest bardziej zmienna u drożdży niż u wyższych *Eukariota*. Wydaje się, że nie ma zdefiniowanego, analogicznego do bakteryjnego, miejsca wiązania rybosomów. Jednak geny, które ulegają silnej ekspresji mają nie ulegającą translacji



sekwencję liderową, bogatą w adeninę i ubogą w guaninę. W przypadku, gdy heterologiczny gen nie spełnia tego warunku, zaleca się wprowadzenie takiej sekwencji (4), która może być włączona w miejsce restrykcyjne ER1 jak to jest pokazane na rys. 1.



Rys. 1. Drożdżowa kasetka ekspresyjna składa się z trzech funkcjonalnych komponent: promotora, heterologicznego genu oraz terminatora transkrypcji. RE1 i RE2 oznaczają miejsca restrykcyjne służące do klonowania.

#### 4. Wektory pochodzące od $2\mu$ plazmidu

W konstrukcji wielokopijnych wektorów drożdżowych wykorzystuje się sekwencje pochodzące z  $2\mu$  kolistego plazmidu drożdżowego, który występuje w większości szczepów laboratoryjnych *S. cerevisiae*. Dotąd nie znana jest jego funkcja. Mechanizm replikacji  $2\mu$  plazmidu jest bardzo podobny do replikacji chromosomu i zachodzi jedynie w czasie fazy S cyklu komórkowego, większość  $2\mu$  plazmidów replikuje raz w cyklu komórkowym. Stabilność  $2\mu$  plazmidów w komórce zapewnia mechanizm utrzymujący je w wysokiej liczbie kopii (ok. 60 kopii na haploidalny genom) i minimalne tempo tracenia plazmidu (19, 41). Liczba kopii  $2\mu$  plazmidu jest specyficzna dla niosącego go szczepu i nie zmienia się po transformacji wektorem ekspresyjnym (20). Prawidłowy rozdział  $2\mu$  DNA z komórki matczynej do komórki potomnej po replikacji, wymaga działania produktów genów REP1 i REP2, oraz STB. Pomimo istnienia mechanizmu dziedziczenia  $2\mu$  DNA, obserwuje się z częstotliwością  $10^{-4}$  (17) powstawanie komórek pozbawionych  $2\mu$  plazmidu ( $cir^0$ ). Jest to wielokrotnie wyższa częstość niż zakładana teoretycznie (przy 60 kopiach na komórkę prawdopodobieństwo losowego otrzymania fenotypu  $cir^0$  jest  $10^{-36}$ ). Wydaje się, że jest to spowodowane szczególnymi właściwościami fizjologicznymi komórki, a zwłaszcza nukleoplazmy (44).

Duża liczba kopii  $2\mu$  plazmidów na komórkę i ich stabilność (pomimo niewydajnego systemu przekazywania cząsteczek podczas mitozy) sugeruje mechanizm ich amplifikacji. Zakłada się, że amplifikacja  $2\mu$  DNA zachodzi wg modelu toczącego się kółka, którego zasadniczym elementem jest produkt genu FLP oraz struktury odwróconych powtórzeń (IR1 oraz IR2). Produkt genu FLP jest kontrolowany na poziomie transkrypcji. Kompleks białek produktów genów REP1 i REP2, może powodować represję transkrypcji genu FLP. Z drugiej strony wydaje się, że produkt genu D (RAF) może pozytywnie



oddziaływać na ekspresję genu FLP (42).

Wektory drożdżowe wykorzystujące 2 $\mu$  DNA mają cechy charakterystyczne dla 2 $\mu$  plazmidu tzn. są stabilne i występują w znacznej liczbie kopii na komórkę, choć niekoniecznie muszą zawierać wszystkie jego elementy. Szczególnie geny FLP i RAF, pochodzące z 2 $\mu$ , są zastępowane przez geny służące do selekcji komórek niosących wektor lub przez kasetę ekspresyjną (np. pJDB219 jest flp-, raf- a pJDB248 FLP+, raf-) (21, 6).

Wewnątrzcząsteczkowa rekombinacja endogennego 2 $\mu$  plazmidu jest zdarzeniem miejscowo specyficznym, ograniczonym do struktur odwróconych powtórzeń, w którym pośredniczy produkt genu FLP (20). Taka rekombinacja może również wystąpić między wektorem ekspresyjnym a endogennym 2 $\mu$  plazmidem powodując niekorzystną restrukturyzację wektora. Jeśli wektor zawiera miejsca specyficzne dla rekombinacji (*target sites*), którymi są miejsca odwróconych powtórzeń IR1 i IR2, a szczep biorcy zawiera 2 $\mu$  DNA, to w rezultacie ten ostatni może zostać włączony w wektor, w miejscu IR. Mutacja w miejscu rozpoznawanym przez produkt genu FLP w wektorze pJDB207 całkowicie eliminuje rekombinację z 2 $\mu$  plazmidem (44).

## 5. Wektory zawierające sekwencje ARS oraz CEN

Do konstrukcji wektorów ekspresyjnych zastosowano również inne fragmenty DNA drożdżowego zdolne do autonomicznej replikacji, które nazwano ARS (*Autonomously Replicating Sequence*). Uważa się, że są one miejscami startu replikacji genomowego DNA (55). Wektory zawierające element ARS również podlegają replikacji raz w cyklu komórkowym, ale mogą gromadzić się w komórce na skutek nierównocennej segregacji podczas podziału komórki (16). Wektory te są mitotycznie niestabilne i w hodowli prowadzonej bez presji selekcyjnej komórki gubią je z częstością 10 – 30% na podział. W typowej hodowli, w warunkach selekcyjnych, jedynie 20 – 30% komórek zawiera plazmid. Komórki pozbawione plazmidu są niezdolne do dalszego wzrostu i ekspresji heterologicznego białka. Cecha ta jest z oczywistych powodów niekorzystna dla wydajnej ekspresji heterologicznych genów.

W przypadkach, gdy produkt ekspresji heterologicznego genu jest dla komórki toksyczny i stabilność plazmidu jest niska można stosować wektory drożdżowe o niskiej liczbie kopii zawierające dodatkowy element: centromerową sekwencję DNA (CEN). Pełni ona rolę centromeru w czasie podziału mitotycznego, co pozwala na zmniejszenie segregacji plazmidu do 1 – 3% na generację w warunkach hodowli nieselekcyjnej (11). Wektor zawierający CEN utrzymuje się stabilnie na poziomie 1 do 2 kopii na haploidalną komórkę. Właściwość ta może być korzystna, np. gdy istnieje silna presja przeciw utrzymywaniu plazmidu w komórce. W dodatku wydaje się, że w niektórych przypadkach sekrecja heterologicznego białka może być bardziej wydajna, gdy system ekspresyjny jest stabilnie utrzymywany w niskiej liczbie kopii (52).



## 6. Markery selekcyjne

Pierwszymi sklonowanymi genami drożdżowymi były geny kodujące enzymy zaangażowane w syntezę aminokwasów i one właśnie posłużyły jako markery selekcyjne w konstrukcji ekspresyjnych wektorów drożdżowych. Geny TRP1, LEU2, HIS3, URA3 są powszechnie używane, gdyż istnieją liczne auksotroficzne szczepy drożdżowe niosące mutacje w odpowiednich genach chromosomalnych. Do selekcji komórek niosących plazmid stosuje się podłoża hodowlane pozbawione tryptofanu, leucyny, histydyny lub uracylu. Ponadto znaleziono kilka dominujących markerów selekcyjnych dla drożdży, takich jak odporność na aminoglikozyd G418 (26) lub metotreksat (35). Ma to istotne znaczenie gdyż poszerza zasięg stosowanych szczepów biorców o linie, które nie posiadają mutacji auksotroficznych. Ponadto zwiększanie nacisku selekcyjnego umożliwia identyfikację szczepów posiadających najwyższą ilość kopii wektora. Wzrost drożdżowych komórek transformowanych plazmidem ekspresyjnym w podłożu selekcyjnym zależy od produktów wymienionych genów, a zatem większa liczba kopii plazmidu na komórkę może prowadzić do większej ilości produktu tych genów i lepszego wzrostu. Natomiast wysoka ilość kopii plazmidu może także zwiększać wydajność syntezy produktu obcego genu, co z kolei może zmniejszać tempo wzrostu. Szczególny przypadek stanowi allel genu LEU2 czyli leu2-d sklonowany przez Beggs (3), który ze względu na uszkodzony promotor ma wielokrotnie obniżony poziom ekspresji. Zaobserwowano, że w warunkach selekcji leucynowej komórki niosące zmutowany gen leu2-d charakteryzują się słabszym wzrostem oraz zwiększoną liczbą kopii plazmidu, wyższą nawet niż poziom endogennego 2m DNA, co rekompensuje słabą ekspresję tego genu (14). Cechę tę wykorzystuje wielu badaczy do podniesienia ekspresji heterologicznego genu. Przykładem może być wzrost poziomu,  $\alpha$ -glukozydazy *Candida tsukubaensis* produkowanej z wielokopijnego plazmidu zawierającego gen leu2d, w hodowli na podłożu pozbawionym leucyny (30). Powyższa argumentacja nie tłumaczy jednak wszystkich cech omawianego systemu. Wykazano (24), że w przypadku ekspresji genu hirudyny pod kontrolą promotora GAP, podniesienie poziomu ekspresji powoduje wyraźny spadek liczby kopii plazmidu połączony z obniżeniem jego stabilności. Na podstawie tych i innych obserwacji wnioskuje się, że średnia liczba kopii wektora na komórkę zależy od równowagi wielu parametrów komórkowych, a jednym z nich jest wydajność syntezy produktu genu komplementującego mutację pokarmową. W komórkach ustala się specyficzna równowaga między liczbą kopii wektora, tempem wzrostu a syntezą produktu obcego genu.

## 7. Sekrecja białek na zewnątrz komórki

Początkowe zainteresowanie sekrecją heterologicznych białek z drożdży było podyktowane spodziewaną łatwością w ich otrzymywaniu i oczyszczaniu. Pierwsze udane eksperymenty nad sekrecją białek heterologicznych w drożdżach



zostały uzyskane dzięki zastosowaniu wektorów sekrecyjnych zawierających sekwencje kodujące peptydy sygnałowe z prekursora czynnika płciowego  $\alpha$  (pre-pro- $\alpha$ F), inwertazy i kwaśnej fosfatazy (48). Obecnie zwraca się uwagę na inne korzystne właściwości produkcji białek heterologicznych w systemach sekrecyjnych. Zaleca się produkowanie obcego białka na drodze sekrecji w przypadkach, gdy może być ono toksyczne dla komórki drożdżowej lub gdy nie jest stabilne w komórce. Wektory sekrecyjne stosuje się również ze względu na możliwość otrzymania białek o naturalnym składzie i konformacji przestrzennej, co stwarza szanse ich terapeutycznego zastosowania. Białka te w naturalnych komórkach często są syntetyzowane jako część dużego, nieaktywnego prekursora, który przechodzi następnie jedną lub kilka potranslacyjnych modyfikacji, takich jak: glikozylacja, proteoliza, fosforylacja czy acetylacja. Procesy te przebiegają w różnych przedziałach komórkowych podczas wewnątrzkomórkowego transportu. Drożdże podobnie jak inne eukariotyczne komórki posiadają kilka oddzielnych, ograniczonych błoną przedziałów (kompartamentów), w których przebiegają specyficzne reakcje biochemiczne. N- oraz O-glikozylacja rozpoczyna się podczas syntezy łańcucha polipeptydowego jednocześnie z transportem nowo powstałego łańcucha przez błonę retikulum endoplazmatycznego (32). W retikulum szorstkim (ER) są formowane mostki dwusiarczkowe i białka ulegają zwinięciu (17). Dodanie kolejnych reszt cukrowych odbywa się w aparacie Golgiego, a specyficzna proteoliza ma miejsce w dystalnych strukturach aparatu Golgiego oraz w pęcherzykach sekrecyjnych (27).

Eukariotyczne białka o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym mają z reguły specyficzny aminokwas na końcu aminokwasowym; rzadko jest to metionina. Metionina jako N-końcowy aminokwas może być usunięta przez aminopeptydazę metioninową (MAP) tylko wtedy, gdy znajduje się w odpowiednim kontekście aminokwasowym (46). W przypadku białek produkowanych z dużą wydajnością część cząsteczek może nie mieć usuniętej metioniny z powodu niskiej wydajności MAP. W tych warunkach produkowane białko będące analogiem produktu naturalnego, może mieć zmienioną aktywność i właściwości. Produkowanie białek na drodze sekrecji pozwala na zachowanie naturalnego N-końca.

Wiele białek o istotnym znaczeniu aplikacyjnym zawiera mostki dwusiarczkowe. Cytoplazma komórki jest środowiskiem redukującym i dlatego niewiele, jeśli w ogóle, białek cytoplazmatycznych zawiera mostki dwusiarczkowe. Z tego względu bezpośrednia ekspresja niektórych białek heterologicznych powoduje nieprawidłowe zwinięcie produktu, który może być ponadto nierozpuszczalny (53). Takie białka muszą być następnie ekstrahowane i poddane procesowi zwijania *in vitro*. Formowanie struktury czwartorzędowej zachodzi z bardzo zmienną wydajnością, a nawet w niektórych przypadkach może nie być zrealizowane. Syntezę mostków dwusiarczkowych w wydzielanych białkach katalizuje prawdopodobnie izomeraza dwusiarczkowa (EC 5.3.4.1) (17), enzym zlokalizowany na wewnętrznej stronie (*luminal side*) retikulum endoplazmatycznego. W drożdżowym systemie sekrecyjnym heterologiczne białka uzyskują prawidłową strukturę przestrzenną. Wykazano, że interferon  $\alpha$ , ludzki czynnik wzrostowy komórek epidermalnych (hEGF) (7),



a także inne białka produkowane w drożdżach mają identycznie uformowane mostki dwusiarczkowe jak w białkach naturalnych. W pewnych przypadkach obserwowano przypadkowe tworzenie się mostków S-S: np. w nie ulegającym sekrecji białku t-PA (ludzkim tkankowym aktywatorze plazminogenu), mimo wysokiego poziomu ekspresji jego genu (29).

*S. cerevisiae* w czasie wzrostu wydzielają na zewnątrz błony komórkowej takie enzymy jak: inwertaza, kwaśna fosfataza czy  $\alpha$ -galaktozydaza, głównie zatrzymywane w przestrzeni peryplazmatycznej. Inne białka takie jak toksyna killerowa czy czynnik płciowy  $\alpha$  ( $\alpha$ F) są eksportowane do podłoża hodowlanego. Białka sekrecyjne stanowią około 0,5% wszystkich białek komórkowych. Warunkiem koniecznym do sekrecji białek jest działanie mechanizmu umożliwiającego rozpoznanie białek przeznaczonych do wydzielania i wyprowadzenie ich na zewnątrz za pomocą peptydu wyprowadzającego (nazywanego również sekwencją główną lub sygnałną) (8). Zasadnicze cechy tego peptydu są następujące: zasadowy charakter regionu N-końca, centralny region hydrofobowy i polarny region C-końca. Rola peptydu wyprowadzającego w sekrecji została dokładnie zilustrowana w przypadku drożdżowego genu inwertazy SUC2. Zaobserwowano, że w wyniku transkrypcji tego genu powstają dwa różne mRNA: krótki, bez kodonów peptydu wyprowadzającego, przeznaczony do syntezy enzymu potrzebnego w komórce oraz dłuższy, kodujący prekursor enzymu przeznaczonego do sekrecji (9). Pewne aspekty drogi sekrecyjnej dotyczące zwłaszcza peptydów wyprowadzających i enzymów odcinających odpowiednie sekwencje aminokwasowe są różne. Uwolnienie czynnika płciowego  $\alpha$  na zewnątrz komórki wymaga działania aż trzech enzymów: produktu genu KEX2 (kodującego endopeptydazę, która tnie wiązanie peptydowe za sekwencją Lys—Arg), produktu genu STE13 (kodującego dipeptydoamino-peptydazę) oraz karboksypeptydazy B. Enzymy zaangażowane w proces dojrzewania innych białek sekrecyjnych nie są tak dobrze scharakteryzowane.

Etapy sekrecyjnej drogi w *S. cerevisiae* zdefiniowano dzięki izolacji i charakterystyce temperaturowo wrażliwych mutantów, w których poszczególne etapy transportu białka są zablokowane. W restrykcyjnej temperaturze mutanty nazwane *sec* akumulują w różnych przedziałach komórkowych prekursorowe formy wydzielanego białka (45).

Udowodniono, że w *S. cerevisiae* można stosować wektory sekrecyjne zawierające sekwencje kodujące peptydy wyprowadzające, pochodzące zarówno z drożdży jak i z innych organizmów, łącznie z ludzkim (47). Świadczy to że mechanizm transportu białek został zachowany w ewolucji. Najczęściej wykorzystuje się peptydy wyprowadzające czynnika płciowego  $\alpha$  lub inwertazy. Ostatnio wykorzystano do syntezy hirudyny nowy peptyd wyprowadzający pochodzący z  $\beta$ -glukanazy zlokalizowanej w ścianie komórki drożdżowej (1). Zastosowanie drożdżowego promotora np. UYP1 (47) do ekspresji obcego białka z jego własnym peptydem głównym nie zawsze umożliwia sekrecję obcego białka. W przeciwieństwie do pszenicznej i ludzkiej  $\alpha$ -amylazy z odpowiednim roślinnym i ludzkim peptydem wyprowadzającym (43) nie obserwowano sekrecji ludzkiej  $\alpha$  antytrypsyny.



Zjawisko sekrecji heterologicznego białka za pomocą różnych peptydów wyprowadzających szczegółowo zanalizowano w przypadku albuminy surowicy ludzkiej (HSA). Zastosowano 5 różnych peptydów wyprowadzających: homologiczny, tzw prepro-peptyd czynnika płciowego  $\alpha$  (prepro-MF $\alpha$ ), heterologiczny prepro-peptyd albuminy (prepro-HSA) oraz dwa warianty peptydów wyprowadzających toksyny killerowej drożdży *Kluyveromyces lactis* i hybrydowy peptyd killer toksyny oraz czynnika  $\alpha$ . We wszystkich przypadkach uzyskano wydajną sekrecję ludzkiej albuminy od 20 do 55 mg l<sup>-1</sup>. Wykazano przy tym, że obecność lub brak miejsc glikozylacji nie ma wpływu na poziom sekrecji HSA do podłoża hodowlanego, oraz że produkt jest właściwie trawiony przez enzym (produkt genu KEX2) odcinający sekwencję wiodącą podczas drogi sekrecyjnej w komórce. Nie obserwowano pośrednich produktów tej obróbki potranslacyjnej. Natomiast istotne różnice w wydajności sekrecji wystąpiły pomiędzy wybranymi do badań szczepami drożdżowymi, łącznie z całkowitym jej brakiem w dwóch przypadkach.

Maksymalne możliwości *S.cerevisiae* wydzielania białek na zewnątrz komórki są małe. *Aspergillus niger* wydziela gramy glikoamylazy w litrze podłoża, *Bacillus subtilis* podobne ilości  $\alpha$ -amylazy oraz *Yarrowia lipolytica* wydziela jeszcze więcej alkalicznej proteazy pozakomórkowej. Drożdże piekarnicze charakteryzuje niska zdolność do sekrecji homologicznych białek. *S. cerevisiae* wydziela w sumie mniej niż 100 mg l<sup>-1</sup> inwertazy, czynnika płciowego  $\alpha$  i kwaśnej fosfatazy. Różne białka ssaków jak ludzka albumina HSA oraz niektóre hydrolazy grzybów nitkowatych (16) są wydzielane przez *S. cerevisiae* w ilości 50 – 200 mg l<sup>-1</sup>. Zwiększenie liczby kopii genu kodującego inwertazę pozwala na wzrost syntezy tego białka i jego sekrecji do poziomu 2% rozpuszczalnych białek komórkowych (15), tj. poziomu który odpowiada wydzielaniu 240 mg l<sup>-1</sup> inwertazy przy łatwej do osiągnięcia w fermentorze gęstości suchej masy drożdżowej 60 g l<sup>-1</sup>. Zdolność komórek drożdżowych do sekrecji homologicznych białek jest ograniczona jedynie poziomem transkrypcji i translacji informacji genetycznej.

Istnieje kilka udokumentowanych przypadków niewydajnej sekrecji z *S.cerevisiae*. Dotyczą one: cielejcej prochymozyny (48), ludzkiej  $\alpha$ -1 antytrypsyny ( $\alpha$ -1 AT) (37), ludzkiego tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) (33), interferonu konsensus (57) czy ludzkiego lizozymu (25). Niektóre z tych białek są zatrzymywane przez ER, w ilościach znacznie przewyższających te, które wyprowadzane są na zewnątrz. Na przykład  $\alpha$ -1 AT syntetyzowana pod kontrolą silnego promotora jako białko hybrydowe z peptydem wyprowadzającym inwertazy, produkowana jest na poziomie nie przekraczającym 0,4% wszystkich rozpuszczalnych białek. Jednak 80%  $\alpha$ -1 AT pozostaje w komórce, przypuszczalnie związane z ER (37). Podobnie w przypadku prochymozyny, która w mniej niż w 10% była wydzielana do podłoża hodowlanego (42). Zastosowanie wektora z silniejszym promotorem pozwoliło na 5-krotny wzrost wydajności syntezy tego białka, natomiast sekrecja wzrosła tylko o 10% wskazując na naturę „wąskiego gardła” drogi sekrecyjnej. Przewycięzenie tej trudności stało się częściowo możliwe przez zastosowanie supersekrecyjnych mutantów, które umożliwiły zwiększenie sekrecji



tego białka do 30% całkowitej syntezy. Ustalono również, że integracja do chromosomu jednostki transkrypcyjnej prochymozyny w wielu kopiach umożliwiła bardziej wydajną sekrecję w porównaniu z wielokopijnym plazmidem. Podczas gdy integrację przeprowadzono w supersekrecyjnym szczepie poziom sekrecji badanego białka osiągnął ostatecznie  $20 \text{ mg l}^{-1}$ , co oznacza 80-krotne zwiększenie wydajności. Wynik ten również sugeruje, że cechy szczepu w którym odbywa się produkcja heterologicznego białka mogą mieć większe znaczenie niż np. wybór odpowiedniego peptydu wyprowadzającego.

Można stwierdzić, że drożdże *S. cerevisiae* znalazły swoje stałe miejsce jako organizm służący do produkcji i sekrecji niektórych heterologicznych białek, ponieważ oferują unikatową kombinację następujących cech:

- 1) są stosunkowo tanie i łatwe w hodowli;
- 2) procesy regulujące ekspresję genów są dobrze poznane;
- 3) stosunkowo dobrze poznany jest mechanizm sekrecji białek drożdżowych, co umożliwi produkcję niektórych heterologicznych białek identycznych jak te syntetyzowane przez komórki macierzyste.

## Literatura

1. Achstetter T., Nguyen-Juilleret M., Findeli A., Merkamm M., Lemoine Y., (1992), *Gene*, 110, 25.
2. Barr P. J., Cousens L. S., at al., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 16471.
3. Beggs J. D., (1978), *Nature*, 275, 104.
4. Bitter G. A., Egan K. M., (1984), *Gene*, 32, 263.
5. Bitter G. A., Egan K. M., (1988), *Gene*, 69, 193.
6. Bitter G. A., Chen K. K., Banks R. A., Lai P-H., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5330.
7. Brake A. J., Merryweather J. P., at al., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4642.
8. Briggs M. S., Girerash L. M., (1985), *Adv. Prot. Chem.*, 38, 109.
9. Carlson M., Tanssig R., Kustu S., Botstein D., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3, 439.
10. Carter J. J., Yaegashi N., Jenison S. A., Galloway D. A., (1991), *Virology*, 182, 513.
11. Clarke L., Carbon J., (1980), *Nature*, 287, 504.
12. Cousens L. S., Shuster J. R., at al., (1987), *Gene*, 61, 26513.
13. Denis C. L., Ciriacy M., Young E. T., (1981), *J. Mol. Biol.*, 148, 355.
14. Erhart E., Hollenberg C. P., (1983), *J. Bacteriol.*, 156, 625.
15. Esmon P. C., Esmon B., Schauer I. E., Taylor A., Schekman R., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 4387.
16. Fangman W. L., Hice R. H., Chlebowicz-Slediewska E., (1983), *Cell*, 32, 831.
17. Freedman R. B., (1984), *Trends Biochem. Sci.*, 106, 438.
18. Fitcher A. B., (1988), *Yeast*, 4, 27.
19. Fitcher A. B., Cox B. S., (1983), *J. Bacteriol.*, 154, 612.
20. Gerbaud C., Guerineau M., (1980), *Current Genet.*, 1, 219-228.
21. Goff C. G., Moir D. T., Kohro T., Gravins T., Smith R. A., Yamasaki E., Taunton-Rigby A., (1984), *Gene*, 27, 35.
22. Guarente L., Ptashne M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.*, 78, 2199.
23. Hitzeman R. A., Hagie F. E., Levine H. L., Goedel D. V., Amerer G., Hall B. D., (1981), *Nature*, 293, 717.
24. Janes M., Meyhack B., Zimmermann W., Hinnen A., (1990), *Curr. Genet.*, 18, 97.
25. Jigami Y., Muraki M., Harda N., Tanaka H., (1986), *Gene*, 43, 273.
26. Jimenez A., Davies J., (1980), *Nature*, 287, 869.
27. Julius D., Blair L., Brake A., Spragne G., Thorner J., (1983), *Cell*, 32, 839.
28. Kingsman S. M., Kingsman A. J., (1982), *EMBO J.*, 1, 603.



29. Kingsman S. M., Kingsman A. J., Mellor J., (1987), Trends in Biotechnology, 554, 966.
30. Kinsella B. T., Cantwell B. A., (1991), Yeast, 7, 445.
31. Kramer R. A., Chiara T. M., Schaber M. D., Hilliker S., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., US, 81, 367.
32. Kukuruźnińska M. A., Bergh M. L. E., Jackman B. J., (1987), Annual Review of Biochemistry, 56, 915.
33. Lemont J. F., Wei C-M., Dackowski W. R., (1985), DNA, 4, 419.
34. Meyhack B., Hinnen A., Heim J., (1989), in: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms, Wyd. C.L. Hershberger, S.W. Queener, G. Hegeman, Am.Soc.Microb., 312 – 321.
35. Miyajima A., Miyajama I., Arai K-I., Arai N., (1984), Mol. Cell. Biol., 4, 407.
36. Miyahohora A., Toh-E. A., Nozaki C., Hamada F., Ohtomo N., Matsubara K., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 80, 1.
37. Moir D. T., Dumais D. R., (1987), Gene, 56, 209.
38. Murray J. A. H., Scarpa M., Rossi N., Cesareni G., (1987), EMBO J., 5, 3391.
39. Nakamura Y., Sato T., Emi M., Miyahohara A., Nishide T., Matsubara K., (1986), Gene, 50, 239.
40. Parent S. A., Fenimore C. M., Bostian K. A., (1986), Yeast, 1, 83.
41. Reynolds A. E., Murray A. W., Szostak J. W., (1987), Mol. Cel Biol., 7, 3566.
42. Smith R. A., Duncan M. J., Moir D. T., (1985), Science, 229, 1219.
43. Rothstein S. J., Lahners K. N., Lazarus C. M., Baulcumbe D. C., Gatenby A. A., (1987), Gene, 55, 353.
44. Rudolf H., Hinnen A., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. Wash., 84, 1344.
45. Schekman R., (1985), Annual Review of Cell Biology, 1, 115.
46. Sherman F., Stewart J. W., (1982), in: The Molecular Biology of the Yeast *S. cerevisiae*: Metabolism and Gene Expression, Cold Spring Harbor Lab., 301.
47. Sleep D., Belfield G. P., Goodey A. R., (1990), Bio/Technology, 8, 42.
48. Smith R. A., Duncan M. J., Moir D. T., (1985), Science, 229, 1219.
49. Stępień P. P., Brousseau R., Wu R., Narang S., Thomas D. Y., (1983), Gene, 24, 289.
50. Śledziwski A. Z., Bell A., Kelsay K., MacKay V. L., (1988), Bio/Technology, 6, 411.
51. Tuite M. R., Dobson M. J., Roberts N. A., King R. M., Burke D.C., Kingsman S.M. and Kingsman A.J., (1982), EMBO J., 1, 603.
52. Valenzuela P., Medina A., Rutter W. J., Amerer G., Hall B. D., (1982), Nature, 298, 347.
53. Van Brunt J., (1986), Bio/Technology, 4, 1057.
54. Walton E. F., Yarranton G. T., (1989), in: Molecular and cell biology of yeasts, Blackie, Glasgow, 43.
55. Williamson D. H., (1985), Yeast, 1, 1.
56. Yoshizumi H., Ashikari T., (1987), Trends in Biotechnology 5, 277.
57. Zsebo K. M., Lu H. S., Fieschko J. C., et al., (1986), J. Biol. Chem., 261, 5858.

## Heterologous Gene Expression in *S. cerevisiae*

### Summary

Yeast *S.cerevisiae* plays an important role of a host for heterologous gene expression and protein secretion. High-level expression of foreign genes in *S. cerevisiae* is the result of a number of optimized reactions in the cell. In this article I will focus on the vectors designed for efficient expression and secretion of foreign proteins from yeast cells into the medium.

### key words:

gene expression, protein secretion, *S. cerevisiae*, yeast.

### Adres dla korespondencji:

Jolanta Topczewska, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02 – 532 Warszawa.