



## Niekonwencjonalne drożdże w produkcji heterologicznych białek

Małgorzata Robak, Ewa Walczak

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

### Nonconventional yeasts in heterologous protein production

#### Summary

The purpose of the paper was to describe nonconventional yeasts: *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Arxula adenivorans*, *Kluyveromyces lactis* and *Debaryomyces hansenii* as affirmed or potential producers of heterologous proteins and biopharmaceutics. Cited species were characterized by genome size, particular physiological aspects and molecular tools used for genetic transformation. Advantages and disadvantages of production systems based on nonconventional yeasts were briefly discussed in comparison to well known industrial processes involving *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* or mammalian cells lines.

#### Key words:

nonconventional yeasts, heterologous protein, gene expression.

### 1. Wstęp

Białka rekombinowane, zwane także heterologicznymi, to białka wytwarzane przez bakterie, drożdże oraz zwierzęce i roślinne linie komórkowe w wyniku ekspresji obcego gatunkowo genu, który przy użyciu metod inżynierii genetycznej został wprowadzony do genomu gospodarza. Podczas wzrostu biorcy, wprowadzony rekombinowany gen ulega ekspresji, a otrzymane ostаточно białko jest białkiem heterologicznym, obcym dla gatunku biorcy. Pożądaný produkt jest następnie oczyszczany. Te innowacyjnie uzyskane białka są od dawna cennymi, stosowanymi biofarmaceutykami oraz preparatami wykorzystywanymi w diagnostyce oraz w przemyśle spożywczym, paszowym i chemicznym (1-5).

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Robak,  
Katedra Biotechnologii  
i Mikrobiologii Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności,  
Uniwersytet Przyrodniczy,  
ul. Norwida 25/27,  
50-375 Wrocław.

Obecnie na rynku biofarmaceutyków jest ponad 100 preparatów pozyskanych z udziałem genetycznie zmodyfikowanych komórek (<http://www.biopharma.com>). Głównie są to preparaty insuliny, hormony, czynniki krzepliwości krwi, interferony i poliwalentne szczepionki (2,6,7). Corocznie ich liczba wzrasta o kilka nowych preparatów. W latach 2007-2008 dopuszczono 22 nowe leki, z których jedynie 8 było pozyskanych z wykorzystaniem technologii rekombinowanego DNA (<http://www.biopharma.com>). Natomiast liczba testowanych biofarmaceutyków pozyskiwanych metodą inżynierii genetycznej gwałtownie rośnie (6,8,9). Takim cennym i zarazem polskim produktem biotechnologicznym jest „Gensulina”, wprowadzona na rynek w 2001 r. przez firmę Bioton (2,10). Specyfik ten wprowadzono na rynek dwadzieścia lat po dopuszczeniu do leczenia pierwszego preparatu tego hormonu otrzymanego na drodze inżynierii genetycznej. Jest to jeden z sześciu dopuszczonych do obrotu preparatów rekombinowanej insuliny (11). Jeden z nich (Velosulin) w styczniu 2009 r. z przyczyn ekonomicznych wycofano z rynku (<http://www.emea.europa.eu>).

Przykładami rekombinowanych enzymów pozyskanych metodą inżynierii genetycznej i produkowanych przez genetycznie zmodyfikowane drożdże są: lakaza (12, 13), chymozyna (14), glikoamylaza (15,16), ksylanaza (15,17,18), inwertaza (19,20), galaktozydaza (15), fitaza (3,21,22) oraz ostatnio pozyskana liaza alginianowa (23). Heterologiczne białka są też przedmiotem licznych badań podstawowych i dotyczących ich potencjalnego zastosowania w bioremediacji środowiska (12,13,24).

Planując produkcję heterologicznego białka należy dokładnie przeanalizować każdy jej etap. Począwszy od wyboru odpowiedniego systemu ekspresyjnego, poprzez optymalizację wszystkich czynników mających wpływ na hodowlę komórek w warunkach nadekspresji określonego białka, po dostosowanie sekwencji wektora oraz genu kodującego białko do systemu biosyntezy i sekrecji białek gospodarza. Najistotniejszy jest wybór gospodarza oraz odpowiednich narzędzi molekularnych, sprawnie ułatwiających pozyskanie genetycznie zmodyfikowanego szczepu.

Pierwszymi organizmami stosowanymi do produkcji obcych białek były bakterie *Escherichia coli* i drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*. Podstawowym powodem, dla którego gatunki te zostały wybrane do produkcji heterologicznych białek były szczegółowe informacje jakie zgromadzono na temat ich proteomu, genomu oraz cech fizjologicznych i systemów hodowli. Z dostępnych na rynku rekombinowanych biofarmaceutyków około 39% zostało wyprodukowanych na bazie: *E. coli*, 15% drożdży (głównie *S. cerevisiae*) i 35% linii komórkowych pozyskanych w wyniku genetycznych modyfikacji komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) (7). Ze względu jednak na wysokie koszty hodowli tkankowych, małą wydajność niektórych systemów lub nieprawidłowości w strukturze uzyskanego białka, ciągle poszukiwani są „nowi gospodarze”, tak aby produkcja heterologicznych białek była wydajna, opłacalna lub gwarantowała otrzymanie białka identycznego z ludzkim. Trzeba zatem dokonać takiego wyboru gospodarza, aby procesy potranslacyjnych modyfikacji białek (glikozylacja, acetylacja, fosforylacja, ubikwitynacja czy przyłączanie białek

SUMO) były najbardziej zbliżone do zachodzących u człowieka, dając w efekcie białko o konformacji i funkcji ludzkiego białka natywnego (1,6,25,26). Wtedy, wyprodukowane leki będą nietoksyczne i aktywne biologicznie, a ich zastosowanie w medycynie nie będzie stanowiło zagrożenia.

Jednym z podstawowych narzędzi umożliwiającym wprowadzenie obcego genu jest wektor, określane także jako plazmid. Plazmidy (wektory) można podzielić według kilku kryteriów. Ze względu na pochodzenie i zawarte sekwencje wyróżniamy wektory wirusowe, bakteryjne, drożdżowe, wahadłowe, ekspresyjne czy wprowadzające delecję; na podstawie sposobu oddziaływania z genomem gospodarza: replikacyjne i integracyjne; na podstawie liczby kopii utrzymujących się w komórce: jednokopijne i wielkokopijne. Wektor musi nieść gen reporterowy (marker), tak aby możliwa była selekcja komórek, które przyjęły konstrukt z genem obcego białka. Jako markery wykorzystuje się geny oporności na antybiotyki, gen *GFP* (oraz liczne jego modyfikacje), geny umożliwiające wykorzystanie specyficznych substratów węglowych czy uszkodzone geny warunkujące różne auktotrofie.

Następnym, ważnym elementem w procesie syntezy heterologicznych białek jest jej regulacja. Wydajną i kontrolowaną ekspresję genów, prowadzącą do ekonomicznie opłacalnej produkcji białek, zapewnia dobór sekwencji promotorowej. W celu wydzielenia właściwego białka poza komórkę niezbędny jest fragment DNA kodujący peptyd sygnałny, który pozwala na transport białka przez błonę komórkową, do pożywki hodowlanej. Bardzo często sekrecja białka jest także uwarunkowana obecnością i typem potranslacyjnych modyfikacji. Brak potranslacyjnych modyfikacji białek i systemu sekrecji u *E. coli* często powoduje nagromadzenie produktu w wewnątrzkomórkowych inkluzjach (27).

Ilość produkowanego rekombinowanego białka zależy także od warunków prowadzenia hodowli, które z kolei wpływają, przynajmniej częściowo, na sposób pozyskiwania białka, jego jakość (czystość) i wydajność. Dlatego bardzo ważnym elementem jest optymalizacja parametrów hodowli (m.in. wybór bioreaktora, skład podłoża, gęstość inokulum, kontrola pH, temperatury i natlenienia i in.) zapewniająca zarówno odpowiedni wzrost gospodarza, wysoką ekspresję obcego genu jak i wydajną sekrecję produktu. Etap optymalizacji procesu biosyntezy i powiększenia skali bardzo często jest trudny do ustalenia i z tego powodu wielu ciekawych rozwiązań (opisanych dla skali laboratoryjnej) nie można było wprowadzić do praktyki przemysłowej (16,28).

Celem pracy jest prezentacja „niekonwencjonalnych” drożdży jako sprawdzonych lub potencjalnych producentów heterologicznych białek. Gatunki drożdży inne niż dobrze znane drożdże pączkujące *S. cerevisiae* oraz rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe* są umownie nazywane drożdżami niekonwencjonalnymi (29,30). Do tej grupy zaliczane są m.in. takie gatunki jak: *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Arxula adenivorans*, *Kluyveromyces lactis* oraz *Debaryomyces hansenii*. W pracy przedstawiono krótką charakterystykę wymienionych gatunków drożdży oraz narzędzi inżynierii genetycznej służących ekspresji heterologicznych genów. Dla porówna-

nia przytoczono również informacje dotyczące obu konwencjonalnych gatunków. W podsumowaniu opisano zalety i wady systemów produkcji opartych na niekonwencjonalnych drożdżach w odniesieniu do procesów stosowanych na skalę przemysłową z udziałem *E. coli*, *S. cerevisiae* czy CHO.

## 2. *Saccharomyces cerevisiae*

Szerokie zastosowanie drożdży *S. cerevisiae* w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, a także w biotechnologii jest związane z faktem, że posiadają one status GRAS (ang. *Generally Recognised As Safe*), a stosowane od stuleci, sprawdziły się jako niepatogenne dla człowieka. Drożdże te były pierwszym organizmem eukariotycznym dla którego poznano pełną sekwencja nukleotydów w genomie (<http://www.yeastgenome.org/>). Wielkość genomu jądrowego zorganizowanego w szesnastu chromosomach wynosi ponad 12 Mbp, a mitochondrialnego 84 kbp. Obok jądrowego i mitochondrialnego materiału genetycznego większość szczepów laboratoryjnych zawiera naturalnie występujący kolisty plazmid 2  $\mu$ , który był pierwszym wektorem wykorzystywanym do transformacji drożdży. Najczęściej do wprowadzenia obcego DNA do komórek *S. cerevisiae* wykorzystuje się wektory wahadłowe (bifunkcyjne), zawierające sekwencje potrzebne do replikacji i selekcji u bakterii oraz u drożdży. Czynniki selekcyjnymi są głównie uszkodzone geny warunkujące auktotrofię pokarmową. Uszkodzony drożdżowy gen *URA3* (kodujący syntazę dekarboksylazy 5'-fosforotonianu) oraz defektywny gen *LEU2* (kodujący dehydrogenazę  $\beta$ -izopropylglabłczanu) warunkują odpowiednio auktotrofię uracylową i leucynową (31). Obecnie w lecznictwie jest dostępnych 7 preparatów insuliny, 14 preparatów poliwalentnych szczepionek dla dzieci oraz 2 leki wpływające na krwiotętność wyprodukowane za pośrednictwem *S. cerevisiae* (1,31). Całkowicie bezpieczne preparaty wprowadzono do lecznictwa głównie w latach 1996-2002. Warto w tym miejscu przypomnieć, że pierwszą „drożdżową” szczepionkę, przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby, wprowadziła firma Merck już w 1986 r. W tabeli 1 zebrano pierwsze rekombinowane białka, które wyprodukowano z udziałem drożdży piekarniczych (14). Nie wszystkie znalazły zastosowanie w lecznictwie.

Tabela 1

Pierwsze heterologiczne białka wyprodukowane przez drożdże *S. cerevisiae*

Produkt	Wykorzystany promotor	Rok otrzymania produktu	Nazwa handlowa, rok zatwierdzenia leku
1	2	3	4
HBsAg powierzchniowy antygen wirusa zapalenia wątroby typu B	<i>P<sub>ADHI</sub></i> dehydrogenazy alkoholowej	1982	Recombivax, 1986 Eugenix, 1989

1	2	3	4
$\alpha$ 1-Antytrypsyna	$P_{ARG3}$ genu szlaku syntezy arginy	1984	brak na rynku
h-EGF epidermalny czynnik wzrostu	$P_{MFG1}$ $\alpha$ -czynnika płciowego	1984	brak na rynku
glukoamylaza	$P_{ENO}$ enolazy	1984	brak na rynku
kapsyd wirusa Epstaina – Barra (EBV)	$P_{GAL1/GAL10}$ genów szlaku utylizacji galaktozy	1987	brak na rynku
h-SOD dysmutaza nadtlenkowa	$P_{GPDH}$ dehydrogenazy aldehydu 3-fosfo- glicerynowego	1987	brak na rynku
HSA albumina surowicy ludzkiej	$P_{PGK}$ kinazy 3-fosfoglicerynianu	1987	brak na rynku
h-interferon $\alpha$	$P_{PHO5}$ fostatazy V	1990	brak na rynku
hirudyna	$P_{CUP1}$ metalotioniny	1994	Refludan, Revasc 1997

### 3. *Schizosaccharomyces pombe*

Gatunek drożdży *Sch. pombe* obok pospolitych drożdży piekarniczych, jest w licznych badaniach modelową komórką eukariotyczną. Zaliczany do wąskiej grupy drożdży rozszczepkowych charakteryzuje się symetrycznym podziałem komórkowym i brakiem zdolności do pączkowania. Nie jest chorobotwórczy dla człowieka. Szczepy tego gatunku są głównie wykorzystywane w przemyśle spirytusowym (32). Genom *Sch. pombe* został całkowicie poznany w 2002 r. ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_pombe/genome](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/genome)). Jego budowa i organizacja jest prostsza niż u *S. cerevisiae*, co przejawia się brakiem zduplikowanych genów i mniejszą liczbą rodzin genowych. Genom, o wielkości ~12,5 Mbp jest zorganizowany w trzech chromosomach.

Skonstruowano już narzędzia molekularne wykorzystywane do transformacji komórek *Sch. pombe* w celu produkcji rekombinowanych białek. Są to plazmidy pREP42 i pREP41 zawierające jako marker gen *GFP* oraz plazmidy pJK148 i pJK210, rekomendowane do integracji homologicznej w gen *LEU* lub *URA* (33-35). Nieintegracyjne plazmidy stosowane u *Sch. pombe* skonstruowano na bazie nietypowych promotorów: zależny od tiaminy  $P_{mnt1+}$  czy od miedzi  $P_{crt4+}$  ([www-rcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html#promoter](http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html#promoter); (36)). Do innych znacznie słabszych konstytutywnych sekwencji promotorowych, także wykorzystywanych w komórkach *Sch. pombe* należy promotor genu *CYCC* (cytochrom C) wykorzystany do ekspresji jednego z genów *HCMV* (ludzkiego cytomegalowirusa), genu *hCG $\alpha$* , (ludzkiej  $\alpha$  podjednostki kosmówkowej gonadotropiny), genu szczurzej somatostatyny oraz genu kodującego antygen *TSV40* (wirus Simian 40) (36).

Drożdże rozszczepkowe nie znalazły, jak dotąd, zastosowania w masowej produkcji rekombinowanych biofarmaceutyków. Jednakże, w ich komórkach uzyskano ekspresję obcych genów kodujących białka człowieka (antytrypsinę, czynnik koagulacji krwi) (37).

#### 4. *Hansenula polymorpha*

Gatunek *H. polymorpha* początkowo określany jako *H. angusta*, a obecnie także jako *Pichia angusta* jest zaliczany do drożdży metylotroficznych. Genom *H. polymorpha* jest częściowo poznany i zorganizowany w postaci sześciu chromosomów (38-40). Szczepami wykorzystywanymi do produkcji heterologicznych białek są głównie transformanty trzech szczepów: *H. polymorpha* CBS4732, *H. polymorpha* DL-1, *H. polymorpha* CBS1976 (41). Dwa pierwsze wyizolowano z gleby, a trzeci z zepsutego, skontrowanego soku pomarańczowego (39). Szczepem preferowanym w badaniach nad ekspresją heterologicznych białek jest szczep *H. polymorpha* DL-1, który oprócz dobrego wzrostu, szybkiej adaptacji do środowiska, charakteryzuje się większą częstotliwością homologicznej rekombinacji niż inne szczepy (38). Do transformacji szczepów *H. polymorpha* wykorzystywane są wektory wahadłowe, zawierające sekwencje *HARS1* (*ARS1 H. polymorpha* autonomicznie replikujące się sekwencje DNA), które mogą integrować w wiele miejsc w DNA gospodarza (42).

Promotorami najczęściej wykorzystywanymi do regulacji ekspresji genów obcych białek jest konstytutywny promotor genu *TPS1* (syntaza 6-fosforanu trehalozy) oraz promotory genów kodujących enzymy metabolizmu metanolu, promotor genu *MOX* (oksydaza metanolowa) i genu *FMD* (dehydrogenaza mrówczanowa) (21). Promotory te nie są uzależnione od toksycznego dla człowieka metanolu, ulegają indukcji również w obecności glicerolu lub przy limitującym (głodowym) stężeniu glukozy. Przykładem innego, silnego, konstytutywnego promotora jest  $P_{GAP}$  (promotor dehydrogenazy aldehydu 3'-fosfoglicerynowego) i  $P_{PMA1}$  (promotor ATPazy membranowej) (43). Najważniejsze wykorzystywane promotory zebrano w tabeli 2.

Tabela 2

Najważniejsze promotory genów *H. polymorpha*, *P. pastoris* i *Y. lipolytica* wykorzystywane w konstrukcji heterologicznych genów (21,44)

Promotor	Kodowane białko	Właściwości
1	2	3
<b><i>Hansenula polymorpha</i></b>		
$P_{MOX}$	oksydaza metanolu	indukcja metanolem, glicerolem, głodowym stężeniem glukozy, nie jest ściśle zależny od metanolu
$P_{FMD}$	dehydrogenaza mrówczanowa	indukcja metanolem, glicerolem, głodowym stężeniem glukozy, nie jest ściśle zależny od metanolu

1	2	3
<i>P<sub>DHAS</sub></i>	syntaza dihydroksyacetonu	wysoka produktywność, indukowany metanolem
<i>P<sub>GAP</sub></i>	dehydrogenaza aldehydu -3'-fosfoglicerynowego	konstytutywny, wysoka produktywność
<i>P<sub>PMAI</sub></i>		
<i>P<sub>TPSI</sub></i>	ATPaza błonowa	w temp. powyżej 42°C
<i>P<sub>FLDI</sub></i>	syntaza 6-fosforanu trehalozy	konstytutywny, indukcja metanolem, słabsza indukcja prostymi aminami
<i>P<sub>YNTI</sub></i>	kwaśna fosfataza	konstytutywny
<i>P<sub>YNI</sub></i>	transporter azotanowy	indukcja azotanami, represja pochodnymi amonu, rzadko stosowane
<i>P<sub>YNRI</sub></i>	reduktazy azotynowe	indukcja azotanami, represja pochodnymi amonu, rzadko stosowane
<b><i>Pichia pastoris</i></b>		
<i>P<sub>AOXI</sub></i>	oksydaza alkoholowa	ściśle uzależniony od metanolu, wysoka wydajność
<i>P<sub>GAP</sub></i>	dehydrogenaza 3'-fosforanu aldehydu glicerynowego	konstytutywny, indukowany glukozą, nie wymaga metanolu
<i>P<sub>FLDI</sub></i>	dehydrogenaza aldehydu mrówkowego	indukowany metanolem, glukozą, siarczanem amonu, metyloaminą
<i>P<sub>PEX8</sub></i>	peroksysomalne białko matrix	słabszy promotor, indukowany glukozą, w niewielkim stopniu represjonowany metanolem
<i>P<sub>YPTI</sub></i>	GTPaza	konstytutywny, indukowany glukozą, metanolem, manitolem
<b><i>Yarrowia lipolytica</i></b>		
<i>P<sub>LEU2</sub></i>	dehydrogenaza β-izopropylolajbczanu	indukcja prekursorem leucyny
<i>P<sub>XPR2</sub></i>	alkaliczna proteaza	indukcja peptonem
<i>P<sub>POX2</sub></i>	oksydaza 2-acylo-CoA	indukcja kw. tłuszczowymi, ich pochodnymi i alkanami
<i>P<sub>POTI</sub></i>	tiolaza 3-okso-acylo-CoA	indukcja kw. tłuszczowymi, ich pochodnymi i alkanami
<i>P<sub>ICLI</sub></i>	liaza izocytrynianowa	indukcja kw. tłuszczowymi, ich pochodnymi, alkanami, etanolem oraz octanem
<i>P<sub>G3P</sub></i>	dehydrogenaza aldehydu -3'-fosfoglicerynowego	
<i>hpd4</i>	hybrydowy pochodzący od <i>P<sub>PRX2</sub></i>	indukcja glicerolem
<i>P<sub>POX1</sub></i>	oksydaza 1-acylo-CoA	zależny od fazy wzrostu
<i>P<sub>POX5</sub></i>	oksydaza 5-acylo-CoA	słaba indukcja alkanami
<i>P<sub>TEF</sub></i>	czynnik EF-1 α elongacji translacji	słaba indukcja alkanami
<i>P<sub>RPS7</sub></i>	rybosomalne białka S7	konstytutywny
<i>P<sub>MTP</sub></i>	metalotioniny 1 i 2	konstytutywny
		słaba indukcja alkanami, indukcja solami metali

Drożdże *H. polymorpha* są już stosowane w przemysłowej produkcji rekombinowanych białek (tab. 3). Najwydajniej produkowana jest fitaza wydzielana w ilości 13,5 g/L hodowli [<http://www.artes-biotechnology.com>]. Technologia produkcji rekombinowanych enzymów z udziałem tego gatunku drożdży w 2002 r. uzyskała status GRAS (<http://www.biotechresources.com>).

Tabela 3

Wybrane heterologiczne białka produkowane przez *H. polymorpha* (44, <http://www.artes-biotechnology.com>)

Kategoria	Produkt	Status	Nazwa rynkowa
farmaceutyki	HBsAg powierzchniowy antygen wirusa zapalenia wątroby typu B	produkcja rozpoczęta	Hepa Vax
	HbsAg powierzchniowy antygen wirusa zapalenia wątroby typu B	produkcja rozpoczęta	AgB
	insulina	produkcja rozpoczęta	Vosulin, obecnie wycofany
	IFN $\alpha$ -2a ludzki interferon alfa 2a	<b>odmowa dopuszczenia*</b>	
	HSA albumina surowicy ludzkiej	produkcja rozpoczęta	brak dostępnych danych
	EGF naskórkowy czynnik wzrostu	produkcja na skalę laboratoryjną zakończona	brak dostępnych danych
dotatki do żywności	oksydaza heksozy	produkcja rozpoczęta	Grindamyl Suerebake
dotatki do pasz	fitaza	produkcja rozpoczęta	Quantum Phytase

\* preparaty Roferon A i Alferon A/Alpheron A dopuszczone do stosowania u ludzi są uzyskane w wyniku genetycznej transformacji komórek *E. coli*.

## 5. *Pichia pastoris*

*P. pastoris* zaliczane są do grupy drożdży metylotroficznych, podobnie jak *H. polymorpha*. Genom tego gatunku o wielkości 9,5-9,8 Mbp jest zorganizowany w czterech chromosomach o wielkości zmiennej w zależności od szczepu (44,45).

W przeciągu ostatnich piętnastu lat za pośrednictwem *P. pastoris* otrzymano ponad 400 rekombinowanych białek, z których kilka jest już na rynku biofarmaceutyków (45,46). Przykładem może być albumina surowicy ludzkiej produkowana pod handlową nazwą „Albrec<sup>®</sup>”, którego producentem jest firma Mitsubishi Pharma Corporation z Japonii (21,46). Na etapie badań klinicznych są inhibitory endostatyn i angiostatyn, a powierzchniowy antygen kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu B jest powszechnie stosowany jako szczepionka przeciwko tej chorobie w Ameryce Południowej (21). Wszystkie szczepy stosowane do tego celu pochodzą od szczepu *P. pastoris* NRRL-Y11430 z Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, USA.

Pomimo że dla tego gatunku opracowano wiele wektorów i jest on znany jako najbardziej wydajny system ekspresji obcych genów, liczba danych dotyczących fi-



zjologii i genetyki jest skąpa (18,48). W Polsce też są prowadzone badania nad produkcją heterologicznych białek z udziałem *P. pastoris* (5,49).

Podstawową cechą wykorzystywaną u tych drożdży w biotechnologicznej produkcji heterologicznych białek jest ich zdolność do utylizowania metanolu jako źródła węgla (46). Głównie wykorzystywany jest promotor genu *AOX1*, kodującego oksydazę alkoholową, który efektywnie reguluje ekspresję obcych białek (47). Alternatywnymi rozwiązaniami dla  $P_{AOX}$  są konstytutywne sekwencje promotorowe, nie wymagające toksycznego dla człowieka alkoholu metylowego, takie jak:  $P_{GAP}$ ,  $P_{FLD1}$ ,  $P_{PEX8}$ ,  $P_{YTP1}$  kontrolujące odpowiednio ekspresję: dehydrogenazy aldehydu 3'-fosfoglicerynowego-*GAP*; dehydrogenazy aldehydu mrówkowego-*FLD1*; peroksysomalnego białka-*PEX8*; oraz GTPazy-*YTP1*. Najczęściej wykorzystywane promotory zestawiono w tabeli 2.

Najbardziej popularnym markerem selekcyjnym wykorzystywanym do selekcji transformowanych drożdży *P. pastoris* jest gen oporności na zeocynę (*Zeo<sup>R</sup>*) (21,51). Najczęściej stosowaną u tego gatunku drożdży sekwencją sygnałną, umożliwiającą sekrecję rekombinowanego białka poza komórkę, jest  $\alpha$ -czynnik płciowy z *S. cerevisiae* (MFa1) lub sekwencja kodująca peptyd sygnałny w genie *PHO1* (gen kwaśnej fosfatazy) (52,53).

## 6. *Yarrowia lipolytica*

Genom drożdży z gatunku *Y. lipolytica* jest największy spośród wszystkich gatunków należących do klasy Ascomycetes, wynosi 20-22 Mbp. (<http://www.cbi.labri.fr/Genolevures>). Jest zorganizowany w postaci 6 chromosomów (54). Ponadto wyróżnia się spośród innych genomów workowców dużą zawartością par GC, wysoką częstotliwością występowania intronów (13% genów posiada co najmniej jedną sekwencję intronową), nietypową strukturą klastra DNA kodującego rybosomalne RNA oraz małym podobieństwem sekwencji do homologów u innych drożdży.

Gatunek *Y. lipolytica* jest także potencjalnie dobrym producentem heterologicznych białek. Posiada wiele pozytywnych cech fizjologicznych, wpływających na jego przemysłowe zastosowanie. Przede wszystkim drożdże te nie są patogenne i posiadają status GRAS (55). Maksymalna temperatura ich wzrostu nie przekracza 32-34°C i m.in. dlatego są uznawane za bezpieczne (21). Od dawna odgrywają znaczącą rolę w dojrzewaniu serów (56), w produkcji drożdży paszowych i kwasu cytrynowego (57-60),  $\gamma$ -dekalaktonu (61), a także w biotransformacjach alifatycznych związków (62). Gatunek *Y. lipolytica* wyróżnia się spośród innych gatunków drożdży zdolnością sekrecji do pożywki hodowlanej kilku białek enzymatycznych. Drożdże te wydzielają proteazy, lipazy, fosfatazy oraz RNazę i esterazę (63-65).

Pierwszym promotorem o historycznym znaczeniu u *Y. lipolytica* był  $P_{XPR2}$ , promotor genu kodującego alkaliczną proteazę (63). Jest to promotor sprawnie regulujący ekspresję genów, jednak jego kontrola jest ściśle uzależniona od warunków

środowiska. Jest aktywny tylko w pH powyżej 6, a jego indukcja wymaga stosunkowo dużej zawartości peptonu w pożywce hodowlanej. Dlatego obecnie do badań nad produkcją heterologicznych białek, najczęściej stosuje się syntetyczny promotor hp4d (19,64). Aktywność tego promotora jest tak wysoka jak indukowanego  $P_{XPR2}$  i jest on zdolny do regulowania ekspresji obcych genów prawie w każdym medium hodowlanym. Ekspresja genów pod jego kontrolą zachodzi głównie na początku fazy stacjonarnej (65). Jest to korzystne zjawisko w procesach produkcyjnych, ponieważ umożliwia częściowe oddzielenie fazy wzrostu od fazy w której następuje sekrecja białka. Wykorzystywane są także promotory genów kodujących podstawowe enzymy metabolizmu substratów hydrofobowych: liazy izocytrynianowej (*ICL1*), oksydaz acylo-CoA (*POX1*, *POX2* i *POX5*) oraz tiolazy 3-okso-acylo-CoA (*POT1*) (19). Juretzek i wsp. (66) uzyskał najwyższą ekspresję obcych genów stosując promotory *ICL1*, *POT1* i *POX2*. Najważniejsze promotory genów drożdży *Y. lipolytica* scharakteryzowano w tabeli 2.

Do ekspresji obcych genów wykorzystuje się głównie szczepy *Y. lipolytica*: Po1d, Po1f, Po1g i Po1h pochodzące od *Y. lipolytica* W29 (12,64). Szczep ten w celu prowadzenia efektywnej produkcji białek został udoskonalony i poddany modyfikacjom genetycznym. Do jego genomu wprowadzono markery aukstotroficzne (*leu2*, *ura3*) i wyeliminowano geny warunkujące produkcję proteaz, stanowiących ewentualne zagrożenie dla sekrecjonowanych heterologicznych białek. Do genomu niektórych szczepów wprowadzono gen *SUC2* z *S. cerevisiae*, kodujący invertazę, enzym umożliwiający wykorzystywanie sacharozy jako dogodnego, nowe dla tego gatunku źródło węgla (64). Obecnie trwają badania nad pozyskaniem oraz wykorzystaniem transformantów, wyizolowanego w Polsce dzikiego szczepu *Y. lipolytica* A-101, charakteryzującego się szczególnie cennymi właściwościami biotechnologicznymi (produkcja kwasu cytrynowego, bioremediacja) (67,68). Ostatnio uzyskano pierwsze, stabilne transformanty tego szczepu zawierające delecję *ura3* oraz insercję genu *SUC2* pod kontrolą  $P_{XPR2}$  i  $T_{XPR2}$  warunkującą wzrost na sacharozie (69,70).

Czynnikami selekcyjnymi mogą być związki, na które drożdże *Y. lipolytica* są wrażliwe (bleomycyna oraz hygromycyna B), ale najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie selekcyjnych markerów aukstotroficzných, powodując delecję genu *LEU2* lub genu *URA3* (6,65). Od 1998 r. stosuje się sekwencje wprowadzające delecję określonego fragmentu genu *URA3*, umożliwiające selekcję ponownie transformowanych klonów aukstotroficzných (71).

Kolejnym, niezbędnym czynnikiem w produkcji rekombinowanych białek, jest sekwencja sygnałna (peptyd sygnałny), umożliwiająca wydzielenie pożądanych protein poza komórkę, do pożywki hodowlanej. W pracach z *Y. lipolytica* najpowszechniej stosowanym sygnałem jest proregion genu *XPR2*, kodujący krótką sekwencję stanowiącą peptyd sygnałny lub sam preregion tego genu, który także okazał się wystarczający dla wydajnej sekrecji heterologicznych białek (19,62). Stosuje się także preproregion genu *LIP2*, oraz hybrydową sekwencję powstałą z połączenia odpowiednich regionów genów *XPR2* i *LIP2*.

Wektorami umożliwiającymi wprowadzenie informacji genetycznej do komórek *Y. lipolytica* są najczęściej wektory integracyjne (19,62). W opinii Hamsa i Chatto (72) integracyjne wektory odznaczają się wysoką stabilnością, a przy ich zastosowaniu możliwa jest integracja obcego DNA w wiele miejsc oraz uzyskanie wyższego poziomu ekspresji genów. Często zachodzi wtedy rekombinacja homologiczna, umożliwiająca wprowadzenie genu w pożądany region genomu.

Za pomocą systemu ekspresyjnego opierającego się na drożdżach *Y. lipolytica* jako gospodarzach uzyskano ekspresję 43 białek. Najwięcej z nich, 19 otrzymano za pomocą szczepu *Y. lipolytica* Po1d (65). Sześć genów pochodziło z *E. coli*, 2 z wirusów, jeden z sinic, 14 z drożdży i pleśni, 3 z roślin, 17 z ssaków, w tym 12 ludzkich. Większość protein udało się uzyskać w ilościach kilku miligramów na litr (najczęściej 5-20 mg/L), a niektóre nawet w ilości kilkuset mg/L (100 mg/L –  $\beta$ -galaktozydaza, 160 mg/L – prochymozyna, 500 mg/L – białko CD14). Najczęściej wykorzystywano promotor  $P_{XPR2}$  (22 białka) oraz promotor hp4d (17 białek) (64,65). W tabeli 4 zestawiono ludzkie białka, wydzielane przez transformowane szczepy *Y. lipolytica*. Na dzień dzisiejszy żadne z nich nie zostało dopuszczone do stosowania w lecznictwie.

Tabela 4

Ludzkie białka wyprodukowane przez transformowane szczepy *Y. lipolytica* (65)

Białko	Promotor/sygnal sekrecyjny	Opisane przez
anafilatoksyna C5a	$XPR2/ XPR2$ prepro	Davidow i wsp., (1987)
czynnik krzepliwości krwi XIIIa	$XPR2/ XPR2$ prepro, $XPR2/ XPR2$ pre + dipept., $XPR2/ XPR2$ pre	Tharaud i wsp., (1992)
analog proinsuliny	$XPR2/ XPR2$ prepro	James i Strick, (1993)
insulinotropina	$XPR2/ XPR2$ prepro	James i Strick, (1993)
epidermalny czynnik wzrostu	$XPR2/ XPR2$ prepro	Hamsa i wsp., (1998)
tkankowy aktywator plazminogenu	$XPR2/ XPR2$ prepro	Franke, Pfizer, USA
$\alpha$ -fetoproteina	hp4d / $XPR2$ prepro	Uchida, Oriental Yeast, Japonia
B2 mikroglobulina	hp4d / $XPR2$ prepro	Uchida, Oriental Yeast, Japonia
rozpuszczalny wariant CD14	hp4d / hybryda $LIP2$ i $XPR2$ prepro	Gysler i wsp. TYLIM, (2003)
cytochrom P450 1A1	$POX2/$ brak	Nthangeni i wsp. TYLIM, (2003)
przeciwciało anti-Ras, scFv	hp4d / $XPR2$ pre, hp4d / $XPR2$ prepro	Swennen i wsp., (2002)
przeciwciało anti-estradiol, scFv	hp4d / $XPR2$ pre	Chartier, LISM, CNRS, Francja

Niezmiernie istotne jest, aby białka o przyszłym zastosowaniu leczniczym, były identyczne z ludzkimi. Drożdże *Y. lipolytica* są w stanie przeprowadzić proces glikozylacji zbliżony do tego, jaki przeprowadzają ssaki. Na przykład tkankowy aktywator plazminogenu wyprodukowany przez *Y. lipolytica* miał 8-10 reszt mannozowych,

podczas gdy heterologiczne białka produkowane przez *P. pastoris* lub *H. polymorpha* nawet do 14 reszt (64,65).

W porównaniu z innymi drożdżami, gatunek *Y. lipolytica* okazał się wydajniejszym producentem heterologicznych białek. Produkcja ludzkiego antygeny  $\alpha$ -feto-proteiny u tego gatunku była dwa razy większa niż zaobserwowana u *P. pastoris* (64). Podobnie jak ilość przeciwciała anti-Ras, dwukrotnie przewyższała ilość wyprodukowaną przez *Kluyveromyces lactis* (64,65).

## 7. *Arxula adeninivorans*

Szczep *Trichosporon adeninivorans* CBS8244T został wyizolowany z gleby w 1984 r. przez Middelhoven i innych. Był to pierwszy izolat niekonwencjonalnych drożdży, znanych dzisiaj pod gatunkową nazwą *A. adeninivorans*. Drugi szczep *Tr. adeninivorans* LS3 (PAR-4) został wyizolowany z hydrolizatów drewna na Syberii przez Kapultsewicha (73). Cztery kolejne szczepy wyizolowano z gleby bogatej w związki humusowe w Afryce Południowej, a następne trzy wyizolowano z kiszonych kolb kukurydzy w Holandii (74,75). Wszystkie wymienione szczepy łączyły ze sobą dwie wspólne cechy: wykorzystywanie n-alkanów, amin i adeniny jako źródła węgla i energii oraz kserofilność. Podobnie jak *H. polymorpha* drożdże te są zdolne do utylizowania azotanów. Ponadto utylizują: kwas urynowy, skrobię, melibiozę, melozytozę i cukry proste, alkohole oraz kwasy organiczne, z wyjątkiem L-ramnozy, inuliny, laktozy, mleczanu i metanolu (73,74). Są odporne na wysokie temperatury oraz zasolenie. Szczep *A. adeninivorans* LS3 wyrasta w medium zawierającym 20% NaCl i jest zdolny do wzrostu w 48°C. Może przetrwać nawet kilka godzin w 55°C. W zależności od temperatury, w jakiej prowadzona jest hodowla, drożdże te wykazują różnicę w budowie morfologicznej. W temperaturze powyżej 42°C wyrastają w formie grzybni (mycelium). Dimorfizm ten jest odwracalny. Można otrzymać pączkujące komórki prowadząc hodowlę w niższej temperaturze. Należy podkreślić, że drożdże te w stadium grzybni wydzielają większą ilość białek (glukoamylazy i inwertazy) niż komórki pączkujące (75). Temperatura może być zatem czynnikiem regulującym sekcję obcego białka.

Aktualnie rodzaj *Arxula* obejmuje dwa gatunki *A. terrestre* i *A. adeninivorans*, a do badań wykorzystywany jest głównie zmutowany szczep *A. adeninivorans* 153, który już w temperaturze 30°C wyrasta w postaci grzybni (73). Wielkość genomu *A. adeninivorans* jest zbliżona do genomu drożdży *S. cerevisiae* i innych drożdży należących do klasy Ascomycetes (76). Materiał genetyczny jest zorganizowany w postaci czterech chromosomów.

Wektory wykorzystywane do transformacji tego gatunku drożdży, zwykle zawierają sekwencje 25S rDNA z *A. adeninivorans*, kasetę ekspresyjną z genem *hph* z *E. coli* (warunkującą oporność na hygromycynę) oraz konstrukt niosący gen kodujący heterologiczne białko wklonowany między promotor genu TEF lub AHSB4 (*A. adeninivorans*)

a terminator genu *PHO5* (*S. cerevisiae*). W szczepach *A. adenivorans* transformowanych takimi wektorami wykazano wydajną ekspresję genów *LACZ*, *XYLE*, *GF* i *HSA* (77). Wektor pAL-HPH-TEF-GPF był także wykorzystywany w komórkach innych niekonwencjonalnych drożdży, takich jak *D. hansenii*, *Debaryomyces polymorphus*, *H. polymorphaa*, *P. pastoris* i piekarniczych *S. cerevisiae* (77,78).

Opisane cechy fizjologiczne (termooporność, zależny od temperatury dimorfizm, kserofilność, szerokie spektrum substratów) oraz niepatogenność sprawiają, że gatunek drożdży *A. adenivorans* jest postrzegany jako atrakcyjny, modelowy organizm w badaniach biotechnologicznych. Jednym z pierwszych genów, którego ekspresja powiodła się w komórce *A. adenivorans* był gen *XylE Pseudomonas putida* kodujący dioksydazę-2,3-katecholu (79,80). Kolejnymi białkami, wyprodukowanymi przez transformanty *A. adenivorans* były: albumina surowicy ludzkiej, którą uzyskano w ilości od 10 do 50 mg/L i interleukina IL-6 o prawidłowej strukturze trzeciorzędowej (74,77). Obecnie z udziałem tego gatunku produkowany jest fragment przeciwciał (scFv), uzyskiwany w ilości 200 mg/L hodowli w kolbach (<http://www.artes-biotechnology.com>).

## 8. *Kluyveromyces lactis*

Drożdże *K. lactis* są dość blisko spokrewnione z *S. cerevisiae* (81). Wielkość całego genomu *K. lactis* wynosi 10-12 Mbp i jest on zorganizowany w sześciu chromosomach (82). Także organizacja, rozmiar i budowa zespołu rDNA tego gatunku drożdży wykazuje duży stopień podobieństwa do drożdży piekarniczych (<http://www.cbi.la-bri.fr/Genolevures>).

Znaczące podobieństwa pomiędzy budową genów obydwu gatunków drożdży ułatwiają pracę nad udoskonalaniem szczepów drożdży *K. lactis* do wydajnej produkcji rekombinowanych białek (17). Drożdże te od dawna stosowane są do produkcji obcych białek, a Federalna Agencja ds. Żywności i Lekarstw uznała je za bezpieczne (20). Heterologiczne białka otrzymane w komórkach tego gatunku drożdży to chymozyna,  $\alpha$ -galaktozydaza, amylaza, ksylanaza, albumina surowicy ludzkiej (HSA), ludzka interleukina-1 $\beta$ , ludzka-interleukina-1 $\gamma$ , bydłęca- $\beta$ -laktoglobulina (15).

Gatunek drożdży *K. lactis* w przeciwieństwie do *S. cerevisiae* jest zdolny do wykorzystywania laktozy i dlatego sekwencje promotorowe genów kodujących enzymy metabolizmu tego źródła węgla są wykorzystywane jako niezawodna regulacja ekspresji heterologicznych genów (14). Najczęściej wykorzystywany jest promotor genu *LAC4* regulujący ekspresję genu kodującego  $\beta$ -galaktozydazę. Jego aktywność jest regulowana przez galaktozę. Pod jego kontrolą produkowana jest na skalę przemysłową chymozyna oraz inhibitor tripsyny.

Markerami selekcyjnymi transformantów, z wklonowanym genem określonego białka są delekcje standardowych genów *URA3* oraz *LEU2* warunkujących auksotrofię pokarmowe czy genu *TRP1* – gen metabolizmu tryptofanu, lub bakteryjnego genu *Kan<sup>r</sup>* warunkującego oporność na kanamycynę (17).

Wektory stosowane do transformowania komórek *K. lactis* to w przeważającej części plazmidy strukturalnie podobne do naturalnego plazmidu 2  $\mu$  z *S. cerevisiae*. System ekspresyjny gatunku drożdży *K. lactis* opiera się na 1,6  $\mu$  kolistym plazmidzie (pKD1) z *Kluyvermyces drosophilum* (14). Stosowane są głównie dwa typy plazmidu pKD1. Pierwszym typem jest wektor zawierający kompletną sekwencję pKD1 tzw. kompletny-pKD1, który może być klonowany tylko w szczepie gospodarza nie posiadającym naturalnego plazmidu pKD1 (pKD1<sup>0</sup>). Po transformacji komórek kompletnym-pKD1 w komórce może być 20-30 kopii plazmidów, zapewniając dużą liczbę genów heterologicznego białka (83). Należy jednak pamiętać, że duża liczba kopii niekoniecznie warunkuje wydajną produkcję heterologicznego białka. Wadą kompletnego-pKD1 jest jego niestabilność. Całkiem odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku częściowego plazmidu pKD1. Plazmid posiada stabilizacyjny *cis-acting locus* (CSL). Ten typ wektora może być propagowany tylko w tych szczepach, których komórki zawierają już naturalny plazmid pKD1 (pKD1<sup>+</sup>) (83).

Drożdże *K. lactis* są zdolne do sekrecji eukariotycznych białek znacznie bardziej efektywnie niż konwencjonalne drożdże *S. cerevisiae*. Efektywność produkcji rekombinowanych białek wiąże się m.in. z szybkim tempem wzrostu mikroorganizmu, większym spektrum dostępnych substratów jako źródło węgla, brakiem hiperglikozylacji powstających białek oraz z mniejszym szkodliwym wpływem ubocznych metabolitów na wzrost kultury lub otrzymywane produkty (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>). Obecnie dostępne są zestawy do szybkiej transformacji *K. lactis* (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productE1000.asp>).

## 9. *Debaryomyces hansenii*

Drożdże *D. hansenii* są jednym z najważniejszych gatunków drożdży stosowanych w przemyśle spożywczym. Są one wykorzystywane w produkcji win i jako szczepionki starterterowe w serowarstwie (84,85). Najlepiej poznanym szczepem jest szczep *D. hansenii* CBS767, wyizolowany z wiśni. Jego genom o wielkości ~12,2 Mbp. jest zawarty w siedmiu chromosomach (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/DEHA>).

Drożdże te są zdolne do wykorzystywania aromatycznych węglowodorów (naftalen, bifenył i benzopiren) oraz n-alkanów, jako jedyne źródła węgla i energii. Ponadto metabolizują kwas mlekowy i cytrynowy. Posiadają zdolność do wzrostu w środowisku o wysokim zasoleniu i w niskich temperaturach (np. w wodzie morskiej) (85-87). Potrafią także rosnąć w obecności metali ciężkich takich jak kobalt, miedź, cynk i żelazo. Ponieważ są powszechnie stosowane w produkcji żywności, przypuszczalnie nie są patogenne dla człowieka i mogłyby być producentami rekombinowanych białek nawet na skalę przemysłową.

W prowadzonych badaniach do transformowania komórek *D. hansenii* wykorzystywane są plazmidy pMR95 oraz pMR96 zawierające gen oporności na hygromycynę B i uszkodzony gen *URA3* z *S. cerevisiae*, jako czynniki selekcyjne. Są to małe wek-

tory (5,6 i 6,7 kbp), które mogą być używane do klonowania DNA o wielkości 6-10 kbp. Zawierają wiele unikatowych miejsc restrykcji (88). Plazmidem do ekspresji genów u *D. hansenii* jest także pRGM, zawierający gen oporności na ampicylinę *Amp<sup>r</sup>*, gen *URA3* z *S. cerevisiae* i sekwencję *ARSD* (*ARS* z *D. Hansenii*, wyizolowaną z plazmidu pAB83) (87).

Sekwencje promotorowe wykorzystywane do regulacji ekspresji genów to przede wszystkim promotory genów *S. cerevisiae*, które są aktywne w komórkach *D. hansenii* (87). Najczęściej są to: promotor genu *CYC1* kodującego izocytochrom c, promotor *GPD1* genu dehydrogenazy 3-fosfoglicerolu, promotor genu *SME1* kodującego kinazę białkową oraz genu *HSP12* kodującego białko szoku cieplnego. Sygnałami sekrecyjnymi są sekwencje genu *GAA* kodującego  $\alpha$ -galaktozydazę oraz  $\alpha$ -czynnik płciowy, obie z *S. cerevisiae*. Wykorzystanie tego gatunku w procesach produkcji heterologicznych białek jest na razie przedmiotem badań laboratoryjnych.

## 10. Podsumowanie

Pierwszymi organizmami stosowanymi do produkcji heterologicznych białek były bakterie *E. coli* i drożdże piekarnicze *S. cerevisiae*. Na skalę przemysłową drożdże piekarnicze okazały się dobrymi producentami białek terapeutycznych, w wielu przypadkach lepszymi niż bakterie, gromadzące obce białka najczęściej w postaci wewnątrzkomórkowych inkluzji. Nieskomplikowana struktura komórki drożdży, mała liczba genów pozwalająca na dokonywanie łatwych manipulacji genetycznych oraz krótki czas generacji są kolejnymi zaletami promującymi szczepy *S. cerevisiae* jako producentów obcych białek.

Drożdże piekarnicze mają także wady, nie pozostające bez znaczenia dla produkcji heterologicznych białek. Ilość produkowanych białek bywa często mała (brak wydajnych systemów sekrecji białek), a powstający w czasie procesu fermentacji cukrów etanol negatywnie wpływa na produkcję biomasy i wydzielanie białek. Ponadto, w wielu przypadkach potranslacyjne modyfikacje białek zachodzące u *S. cerevisiae* prowadzą do powstawania białek o właściwościach alergicznych dla człowieka. Dlatego zainteresowano się innymi gatunkami drożdży, które w przyszłości mogą stanowić alternatywę do obecnie stosowanych *S. cerevisiae*. Niektóre gatunki odznaczają się lepszą produktywnością, mniejszym stopniem hiperglikozylacji białek i wydajniejszą ich sekrecją, w szczególności tych o dużej masie cząsteczkowej.

W przypadku preparatów o znaczeniu terapeutycznym, dąży się obecnie do produkowania białek o najwyższej jakości, czyli identycznych do naturalnych. Biologiczna aktywność, rozpuszczalność, biodostępność, okres półtrwania, stabilność i immunogenność białek ulegających sekrecji jest uzależniona od potranslacyjnych modyfikacji przeprowadzanych w komórkach. Takie potranslacyjne modyfikacje w komórkach prokariotycznych zachodzą w niewielkim stopniu. Organizmy eukariotyczne pod tym względem różnią się. Drożdże *S. cerevisiae* nie przeprowadzają

reakcji amidowania, niektórych rodzajów fosforylacji i hydroksylacji białek oraz mają tendencję do nadmiernej hiperglikozylacji, przyłączając do wiązania  $\alpha$ -1,3 rdzenia polipeptydów zbyt wiele reszt mannozy (około 50-100). W przypadku drożdży metylotroficznych *P. pastoris* i *H. polymorpha* hiperglikozylacja występuje w znacznie mniejszym stopniu. W zależności od zmodyfikowanego białka przyłączają około 8-14 reszt mannozy do wiązania  $\alpha$ -1,2 i otrzymane produkty są mniej alergenne dla człowieka. Drożdże *Y. lipolytica* przyłączają najkrótszy łańcuch reszt mannozowych (około 8-10). Ich aparat sekrecyjny, w którym jest przeprowadzana potranslacyjna glikozylacja rekombinowanych białek, ze względu na bliższe pokrewieństwo tego gatunku do wyższych Eukaryota jest najbardziej zbliżony do aparatu ssaków. Ważnym aspektem w produkcji heterologicznych białek z udziałem *Y. lipolytica* było uzyskanie szczepów zdolnych do wykorzystania sacharozy, wydzielania inwertazy oraz biosyntezy cytrynianu. Na podstawie takich szczepów, po wprowadzeniu genu kodującego pożądaną białko, można uzyskać transformanty zdolne do wydzielania obcego białka podczas hodowli w medium zawierającym sacharozę, (np. na melasie, tanim surowcu odpadowym).

W celu porównania najważniejszych cech dotyczących produkcji heterologicznych białek, jej bezpieczeństwa, modyfikacji produktów, sekrecji, stanu zaawansowania prac, kosztów i obecności rekombinowanych białek na rynku w tabeli 5 zestawiono stosowne dane. Wynika z nich, że tylko kilka systemów jest wykorzystywanych na skalę przemysłową. Głównym problemem są koszty produkcji, które w przypadku hodowli zwierzęcych linii komórkowych są wysokie. W celu zmniejszenia kosztów produkcji biofarmaceutyków prowadzi się badania nad wykorzystaniem transgenicznych zwierząt wydzielających obce białko w mleku, moczu, nasieniu czy w jajku. W lutym 2009 r., po ponad 4 lata trwających badaniach, dopuszczono jako lek pierwszy specyfik pozyskany z transgenicznej kozy – antytrombinę (ATryn) ([www.medicalnewstoday.com](http://www.medicalnewstoday.com)), a w fazie badań klinicznych są specyfiki izolowane z jaj kurzych (28). Pomimo zachęcających wyników hodowle transgenicznych zwierząt też nie są ekonomicznie opłacalne. Cechuje je niska wydajność i potrzeba odnowy stada. Dlatego produkcja rekombinowanych białek jest przedmiotem licznych i intensywnych badań. Niosą one ze sobą wiele korzyści, nie tylko z naukowego punktu widzenia. Warunkują m.in. rozwój przemysłu biotechnologicznego (także w Polsce). Najintensywniej obecnie są prowadzone badania z udziałem niższych eukariotów. W przeciągu ostatnich 15 lat opisano ponad 500 szczepów niekonwencjonalnych drożdży skonstruowanych do produkcji heterologicznych białek. Tylko dla gatunku *P. pastoris* opisano ponad 400 przykładów. Dla kilkunastu szczepów opracowano wydajną produkcję na skalę przemysłową i białka te zostały dopuszczone do stosowania jako biofarmaceutyki lub preparaty enzymatyczne.



Tabela 5

## Charakterystyka systemów ekspresji heterologicznych białek wykorzystywanych do produkcji leków i enzymów

System ekspresyjny	Grupa	Uzyskane białko		Koszty	Etap badań/ produkcji	Produkty na rynku
		typ glikozylacji	sekrecja, wydajność			
transgeniczne zwierzęta (komórki gruczołu mlekowego)	wyższe Eukaryota	typ człowieka	możliwa, niska	wysokie	produkcja pilotowa	dopuszczono w 2009 r.
komórki ssące	wyższe Eukaryota	typ człowieka	możliwa, niska	wysokie	produkcja przemysłowa	+
komórki roślinne	wyższe Eukaryota	końcowa fruktoza	ograniczona wielkością białka, niska	średnie	badania w skali pilotowej	-
<i>Sordaria macrospora</i>	grzyb strzępkowy	nieznana	możliwa średnia	niskie	badania w skali laboratoryjnej	-
<i>Aspergillus sojae</i>	grzyb strzępkowy	nieznana	możliwa, duża	niskie	badania w skali pilotowej	-
<i>Axula adenivorans</i>	dimorficzne drożdże	nieznana	możliwa, duża	niskie	badania w skali pilotowej	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	dimorficzne drożdże	nieznana	możliwa, duża	niskie	badania w skali laboratoryjnej	-
<i>Pichia pastoris</i>	metalo-troficzne drożdże	brak końcowej $\alpha$ -1,3 mannozy	możliwa, duża	niskie	produkcja przemysłowa	+
<i>Hansenula polymorpha</i>	metalo-troficzne drożdże	brak końcowej $\alpha$ -1,3 mannozy	możliwa, duża	niskie	produkcja przemysłowa	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drożdże piekarskie	nadmierna glikozylacja	możliwa, duża	niskie	produkcja przemysłowa	+
<i>Escherichia coli</i>	bakterie	brak	tylko do przestrzeni peryplazmatycznej, duża	niskie*	produkcja przemysłowa	+

\*konieczność stosowania antybiotyków, obecnie postrzegana jest coraz częściej jako wada.

Należy podkreślić, że kolejną zaletą preparatów otrzymanych z udziałem drożdży jest brak zanieczyszczeń wirusami, prionami czy onkogenami, które mogą mieć miejsce w przypadku biofarmaceutyków produkowanych przy wykorzystaniu zwierzęcych linii komórkowych.

## Literatura

1. Crommelin D. J. A., Sindelar R. D., Meibohm B., (2008), *Pharmaceutical Biotechnology, Fundamentals and Applications*, Informa Healthcare, New York, London.
2. Dubin A., (2007), *Raport: Stan i kierunki rozwoju biogospodarki*, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 1-119.
3. Vassiliou A., (2008), Rozporządzenie Komisji (WE) NR 554/2008 z 17 czerwca 2008 r. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej (18.6.2008).
4. Turkiewicz M., Pazgier M., Donachie S. P., Kalinowska H., (2005), *Polish Polar Research*, 26 (2), 125-136.
5. Ołędzka G., Dąbrowski S., Kur J., (2003), *Protein Expression and Purification*, 29(2), 223-229.
6. Gellissen G., (2005), *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eucaryotic Systems*, Wiley-VCH, Weinheim.
7. Rader R. A., (2008), *BioProcess International*, (6), Supp. 4, 4-9, Westborough, USA.
8. Kieć-Kononowicz K., (2004), *Biotechnologia*, 3(66), 87-100.
9. Jasiński M., Banasiak J., Frankowska M., Figlerowicz M., (2006), *Biotechnologia*, 3(74), 53-66.
10. Krzymień J., Wójcicki J. M., Bogiel M., Karnaferl W., (2003), *Diabetologia Praktyczna*, 4(4), 279-285.
11. Kayser O., (2006), *Podstawy biotechnologii farmaceutycznej*, Wyd. UJ, Kraków.
12. Madzak C., Otterbein L., Chamkha M., Moukha S., Asther M., Gaillardin C., Beckerich J.-M., (2005), *FEMS Yeast Research*, 5, 635-646.
13. Jolivat C., Madzak C., Brault A., Caminad E., Malosse C., Mougouin C., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 450-456.
14. Gellissen G., Hollenberg C., (1997), *Gene*, 190, 87-97.
15. Wartmann T., Kunze G., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 619-624.
16. Nuc P., Nuc K., (2006), *Postępy Biochemii*, 52(4), 448-456.
17. Bergquist P., Gibbs Te'o-M. V., Cziferszky A., Azevedo F. M., Nevalainen H., (2002), *Extremophiles*, 6, 177-184.
18. Mchunu N. P., Singh S., Permaul K., (2009), *Journal of Biotechnology* (w druku, on line od 17 marca 2009).
19. Nicaud J.-M., Madzak C., van den Broek P., Gysler C., Duboc P., Niederberger P., Gaillardin C., (2002), *FEMS Yeast Research*, 2, 371-379.
20. Hsieh H. P., da Silva N. A., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 411-416.
21. Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J. M., Berardi E., Veenhuis M., van der Klei I., (2005), *FEMS Yeast Research*, 5, 1079-1096.
22. Wartmann T., Stoltenburg R., Böer E., Sieber H., Bartelsen O., Gellissen G., Kunze G., (2003), *FEMS Yeast Research*, 3, 223-232.
23. Liu S-Q., Tsao M., (2008), *Food control*, 20(9), 852-855.
24. Kobayashi S., Hirakawa K., Fukuda R., Ohta A., (2008), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(8), 2219-2223.
25. Zhao J., (2007), *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 3017-3033.
26. Eckart M. R., Bussineau C. M., (1996), *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 525-530.
27. Yin J., Li G., Ren X., Herrler G., (2007), *Journal of Biotechnology*, 127, 335-347.
28. Lipiński D., Zeyland J., Słomski R., (2007), *Medycyna Weterynaryjna*, 63(3), 261-263.
29. Wolf K., (1996), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, Springer Verlag., Berlin-Heidelberg-New York.
30. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A. L., Lalue C., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 147-156.
31. Gellissen G., Strasser A., Suckow M., (2005), *Key and Criteria to the Selection of an Expression Platform, Novel Microbial and Eukaryotic Systems*, Ed. Gellissen G., Wiley-VCH, Weimheim, 1, 1-5.
32. Sunnerhagen P., (2002), *Curr. Genet.*, 42, 73-84.
33. Siam R., Dolan W. P., Forsburg S., (2004), *Methods*, 33, 189-198.
34. Craven R. A., Griffiths K. J. F., Sheldrick K. S., Randall R. E., Hagan I. M., Carr A. M., (1998), *Gene*, 221, 59-68.

35. Bellemare D. R., Sanschagrin M., Beaudoin J., Labbé S., (2001), *Gene*, 273, 191-198.
36. Bröker M., Bäuml O., (1989), *FEBS*, 1, 2, (248), 105-110.
37. Kang H. A., Gellissen G., (2005), *Hansenula polymorpha*, in: *Production of Recombinant Proteins, Novel Microbial and Eucaryotic Systems*, Ed. Gellissen G., Wiley-VCH, Weinheim, 6, 111-142.
38. Ramezani-Rad M., Hollenberg P. C., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U., Gellissen G., (2003), *FEMS Yeast Research*, 4, 207-215.
39. Gellissen G., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 741-750.
40. Sherman D. J., Martin T., Nikolski M., Cayla C., Souciet J-L., Durrens P., for *Genolevures Consortium*, (2009), *Nucleic Acids Researches*, 37, D550-D554.
41. Heo J. H., Hong W. K., Cho E. Y., Kim M. W., Kim J. Y., Kim C. H., Rhee S. K., Kang H. A., (2003), *FEMS Yeast Res.*, 4, 175-184.
42. Cox H., Mead D., Sudbery R., Eland M., Evans L., (2000), *Yeasts*, 16, 1191-1203.
43. Ohi H., Okazaki N., Uno S., Miura M., Hiramatsu R., (1989), *Yeast*, 14(10), 895-903.
44. Gellissen G., Kang H. A., (2005), *Hansenula polymorpha*, in: *Production of Recombinant Proteins, Novel Microbial and Eucaryotic Systems*, Ed. Gellissen G., Wiley-VCH, Weinheim, 6, 111-142.
45. Lin Cereghino G. P., Lin Cereghino J., Igen C., Cregg J. M., (2002), *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 329-332.
46. Lin Cereghino J., Cregg J. M., (2000), *FEMS Microbiology Rev.*, 24, 45-66.
47. Gasser B., Mauer M., Rautio J., Sauer M., Bhattacharyya A., Saloheimo M., Penttilä M., Mattanovich D., (2007), *BMC Genomic*, 8, 179.
48. Chang S-W., Shieh C-J., Lee G-C., Akoh C. C., Shaw J-F., (2006), *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 28-40.
49. Wanarska M., Hildebrandt P., Kur J., (2008), *Post. Mikrobiol.*, 47(3), 249-256.
50. Waterham H.R., Digan M. E., Koutz P. J., Lair S. V., Cregg J. M., (1997), *Gene*, 186, 3-44.
51. Brierley R. A., (1998), *Methods Mol. Biol.*, 103, 149-177.
52. Sunga A. J., Cregg J. M., (2004), *Gene*, 330, 39-47.
53. Madzak K., Nicaud J. M., Gaillardin C., (2005), *Yarrowia lipolytica*, in: *Production of Recombinant Proteins, Novel Microbial and Eucaryotic Systems*, Ed. Gellissen G., Wiley-VCH, Weinheim, 8, 163-169.
54. Casaregola S., Neuvéglise C., Lépingle A., Bona E., Feynerol C., Artiguenave F., Wincker P., Gaillardin C., (2000), *FEBS Letters*, 487, 95-100.
55. Yoshida M., Hashimoto K., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50(8), 2117-2118.
56. Wojtatowicz M., Chrzanoska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A., (2001), *Intern. J. Food Microbiol.*, 69, 135-140.
57. Rymowicz W., Żarowska B., Robak M., Rywińska A., Musiał I., (2005), *Inż. i Ap. Chem.*, 44(4s), 90-91.
58. Robak M., (2007), *Acta Sci. Polon. Biotechnol.*, 6, 23-33.
59. Robak M., Rymowicz W., Filipkowski P., (2007), *EJPAU, Biotechnology*, 10(4), 22.
60. Rywińska A., Wojtatowicz M., Rymowicz A., (2006), *EJPAU, Biotechnology*, 9 (1).
61. Pagot Y., Endrizzi A., Nicaud J-M., Belin J-M., (1997), *Lett. Appl. Microbiol.*, 25, 353-361.
62. Kerscher S., Dröse S., Zwicker K., Zickerman V., Brandt U., (2002), *BBA*, 1555, 83-86.
63. Ogrydziak D. M., Demain A. L., Tannenbaum S. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 497-538.
64. Madzak K., Gaillardin C., Beckerich J. M., (2004), *J. Biotechnol.*, 109 (1-2), 63-81.
65. Madzak K., Treton B., Blanchin-Roland S., (2000), *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 207-216.
66. Juretzek T., Wang H. J., Nicaud J. M., Mauersberger S., Barth G., (2000), *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 5, 320-326.
67. Wojtatowicz M., Marchin G. L., Erickson L. E., (1993), *Process Biochemistry*, 28, 453-460.
68. Żogała B., Robak M., Rymowicz W., Wzientek K., Rusin M., Maruszczak J., (2005), *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (5), 665-669.
69. Walczak E., Robak M., Mauersberger S., (2007), *BIOTRANS*, Oviedo, Hiszpania.
70. Walczak E., Lazar Z., Robak M., (2008), *BioTech 2008 & 4<sup>th</sup> Swiss-Czech Symposium (Biopharmaceutical: why use yeasts?)*, Wadenwill (Zurich).
71. le Dall M. T., Nicaud J-M., Gaillardin C., (1994), *Curr. Genet.*, 26, 38-44.

72. Hamsa P. V., Kachroo P., Chattoo B. B., (1998), *Curr. Genet.*, 33, 231-237.
73. Boer E., Gellisen G., Kunze G., (2005), *Arxula adeninovorans*, in: *Production of Recombinant Proteins, Novel Microbial and Eucaryotic Systems*, Ed. Gellissen G., Wiley-VCH, Weinheim, 8, 163-169.
74. Kunze G., Kunze I., (1996), *Arxula adeninovorans*, in: *Nonconventional yeasts*, Ed. Wolf K., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 389-409.
75. Wartmann T., Kunze G., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 619-624.
76. Terentiev Y., Pico H. A., Böer E., Wartmann T., Klabunde J., Breuer U., Babel W., Suckow M., Gellissen G., Kunze G., (2004), *J. Ind. Microbiol. Biotechnology*, 31, 223-228.
77. Wartmann T., Bellebna C., Boer E., Bartelsen O., Gellissen G., Kunze G., (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 528-535.
78. Wartmann T., Böer E., Huarco Pico A., Sieber H., Bartelesen O., Gellissen G., (2002), *FEMS Yeast Research.*, 2, 363-369.
79. Rosel H., Huze G., (1998), *Curr. Genet.*, 33, 157-163.
80. Schaffrath R., Karin D., Breunig K. D., (2000), *Fungal Genetics and Biology*, 30, 173-190.
81. Bolotin-Fukuchra M., Toffano-Nioche C., Artiguenave F., Duchateau-Nguyen G., Lemaire M., Mermeisse R., Montrocher R., Robert C., Termier M., Wincker P., Wésolowski-Louvel M., (2000), *FEBS Letters*, 487, 66-70.
82. Panuwatsuk W., da Silva N. A., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 195-201.
83. Lepinglé A., Casaregola S., Neuvéglise., Bon E., Hguyen H. V., Artigunave F., Wincker P., Gaillardin C., (2000), *FEBS Letters*, 487, 82-86.
84. Liu S-Q., Tsao M., (2008), *Food control*, 20(9), 852-855.
85. Maggi G. R., Govind N. S., (2004), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 301-310.
86. Alba-Lois L., Segal C., Rodarte B., Valdés-López V., de Luna A., Cárdenas R., (2004), *Curr. Microbiol.*, 48, 68-72.
87. Ricaurte M. L., Govind N. S., (1999), *Mar. Biotechnol.*, 1, 15-19.
88. Lesley S. A., Graziano J., Cho C. Y., Knuth M. W., Klock H. E., (2002), *Protein Engineering*, 15(2), 153-160.