مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مروری بر روش های تولید پروتئین های نوترکیب درمانی در مخمر پیشیا پاستوریس

حمید باباولیان[۱]، علی محمد لطیفی *[۱]جعفر امانی*[۲]، احسان صادق نژاد[۱]، فاطمه شاکری[۱]

[۱]دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی ، تهران ، ایران.
[۲]دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی ، تهران ، ایران.

چکیده:

موفقیت سیستم های بیانی مخمر برای بیش از ۲۰ سال جهت تولید پروتئین های نوترکیب امری اثبات شده است. استفاده از مخمر متیلوتروف *Pichia pastoris* به عنوان یک میزبان سلولی جهت بیان پروتئین های نوترکیب در صنعت دارویی طی سالهای اخیر رشد چشم گیری داشته است. سیستم بیانی مخمر *Pichia pastoris* با دارا بودن مزایایی چون دستکاری ژنتیکی آسان، تراکم سلولی بالا نسبت به سلول های پستانداران، دارا بودن پتانسیل بالا جهت تولید پروتئین نو ترکیب فولد شده حامل تغییرات پس از ترجمه، وجود پروموترهای قوی جهت بیان حداکثری پروتئین نو ترکیب و الحاق DNA خطی خارجی حاوی چندین کپی از پروتئین هدف با فرایند نو ترکیبی همولوگی، این پتانسیل را جهت کابرد گسترده در حوضه ی صنعتی و تجاری فراهم نموده است. هدف از این متن مروری، بررسی ویژگی های سیستم بیان مخمر *P.pastoris* از دیدگاه تجربی مهندسی ژنتیک، شیمیایی پروتئین و ملاحظات طراحی مولکولی می باشد که جهت بیان موفق پروتئین نوترکیب مورد نظر ضروری هستند.

کلید واژه: *Pichia pastoris* ، تولید پروتئین نوترکیب ، سیستم های بیانی

مقدمه:

پروتئین ها به عنوان یکی از مهمترین ماکرو مولکولهای عالم بیولوژیکی، در سیستم متابولیکی و کاتابولیکی موجودات زنده نقش مهمی را ایفا می کنند که می توان به درگیری آنها در فرایندهای مهم سلولی از جمله سیگنالینگ سلولی، چسبندگی سلولی، پاسخ های ایمنی و تقسیم سلولی اشاره نمود (۹۶). امروزه تولید تجاری پروتئینها در صنایع آنزیمی، کشاورزی و دارویی با تکیه بر مهندسی پروتئین و مهندسی ژنتیک در حال گسترش است به طوریکه محصولات تولید شده در این صنایع بخش مهمی از نیازهای جوامع را در بر میگیرد. در سال ۱۹۲۲ اولین پروتئین دارویی با نام انسولین توسط Banting و همکاران کشف گردید (۴) و به دنبال آن دوره بیوتکنولوژی مدرن با تاسیس Cetus Corporation در کالیفرنیا در سال ۱۹۷۱ شروع گردید. فرایند تخمیر میکروبی در شرایط هوازی و بی هوازی از اوایل سال ۱۹۰۰ جهت تولید میزان زیادی از مواد شیمیایی مانند اسید سیتریک (۴۵) و استون و بوتانول (۴۱) به ترتیب صورت گرفت. از میان سیستم های مختلف تولید کننده پروتئینهای نوترکیب، سیستم یوکاریوتی به دلیل تولید پروتئین های بزرگ به ویژه پروتئین های غنی از باند دی سولفیدی و تغییرات بعد از ترجمه بروی آنها نسبت به سیستم پروکاریوتی ترجیح داده میشود(۳۰). این در حالی است که سیستم های پروکاریوتیک جهت سنتز پروتئین های کوچک کاراتر است. در میان سیستم های بیان یوکاریوتی، مخمر دارای مزایای بیشتری نسبت به سایر سیستم های بیان میباشد که شامل رشد سریع سلولی، تولید سطوح بالای از رهاسازی پروتئین در محیط کشت، حذف اندوتوکسین و باکتریوفاژ، کمک به فولد شدن پروتئین، امکان دست ورزی ژنتیکی وکتور بیان، فقدان بیماری زایی در انسان، صرفه جویی در هزینه، تنوع در تغییرات پس از ترجمه مانند گلیکلوزاسیون، متیلاسیون، اسیلاسیون و ... و در نهایت توانایی برای جمع آوری پروتئینهای ترشح شده در محیط کشت، بدون آسیب به سلولهای میزبان میباشد(۷۱). امروزه بیش از ۲۰۰

آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی ، تهران ، ایران
Email :amlatify@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۴/۱۷
تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

پروتئین و پلی پپتید با خاصیت دارویی در لیست FDA به چشم می خورد که بعضی از آن ها شامل انسولین انسانی، آلبومین، هورمون رشد انسانی (HGH)، فاکتور VIII و غیره می شود(۳۰). در سال ۲۰۰۴ هزینه ی پروتئین نوترکیب درمانی در بازارهای جهانی معادل ۴۴ بیلیون دلار بوده است که تا انتهای سال ۲۰۱۰ بالغ بر ۷۰ بیلیون دلار آمریکا صرف هزینه ی این ترکیبات دارویی شد(۸۷). امروزه تولید پروتئین های نوترکیب از طریق مهندسی زیستی در سیستم های بیان مخمری مانند *P. pastoris* به صورت قابل توجهی گسترش یافته است. مهمترین ملاحظات برای بهبود و کارایی سیستم بیانی پروتئین های نوترکیب در *p. pastoris*، شامل طراحی وکتور، فولدینگ پروتئین در شبکه آندوپلاسمی، گلیکوزیلاسیون صحیح، سکانس سیگنال ترشحی، دوز ژنی و بهینه سازی فرآیند تخمیر می شود (۲۸). در کل مهندسی مکانیسمهای ترشح پروتئین د ر *P. pastoris* منجر به افزایش بازدهی عملکردی پروتئین های نوترکیب می شود.

تاریخچه ی تولید پروتئین های نوترکیب دارویی در *Pichia pastoris* :

پروتئین های نوترکیب پستانداران در مقیاس گسترده توسط *P. pastoris* تولید شده و به محیط خارج سلولی ترشح می-شود. کمترین مورد گزارش شده با میزان ۱,۵ گرم بر لیتر جهت تولید یک پیش ساز انسولین توسط Wang و همکاران در سال 2001 (۱۱۵) صورت گرفته است. گزارش های دیگر شامل ۴ گرم بر لیتر اینترلوکین داخل سلولی به عنوان ۳۰ درصد پروتئین و ۴ گرم بر لیتر ترشح سرم آلبومین انسان (۲۵) ، ۶ گرم بر لیتر از فاکتور نکروز تومور (۲۶) ، پروتئین های هترولوگ (۷۵) و ۱۰ گرم بر لیتر از فاکتور نکروز تومور (۱۰۳) می باشد. تولید سرم آلبومین در مخمر *P. pastoris* تقریبا ۶۷ برابر *S. cerevisiae* (۱۰ / ۰,۱۵ گرم بر لیتر) می باشد (۸۰) ژلاتین تولید شده در *P. pastoris* بیش از ۱۴ گرم بر لیتر (۱۱۹) گزارش شده است. شواهد حاکی از آن است که *P. pastoris* به صورت حداکثری می تواند ۲۰- ۳۰ گرم بر لیتر پروتئین نوترکیب تولید کند (۷۸). در جدول ۱ به اختصار در مورد تعدادی دیگر از پروتئین های تولید شده توسط مخمر *P. pastoris* که امروزه نقش مهمی را در زمینه بیوتکنولوژی پزشکی ایفا میکنند پرداخته شده است .

Protein	Indication	Reference
Angiostatin	Antiangiogenic factor	[۱۲۲۱۲۷ ,]
Elastase inhibitor	Cystic fibrosis	[۱۲۵]
Endostatin	Antiangiogenic factor	[۷۲]
Epidermal growth factor analog (EGF)	Diabetes	[۹۱،۲۰]
Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	Insulin-like growth factor-1 deficiency	[۱۰۲]
Human serum albumin	Stabilizing blood volume in burns/ shock	[٦٦]
Kallikrein inhibitor ecallantide or kalbitor	Hereditary angioderma	[۲۸]
Human hepatocyte growth factor (HGF)	Mitogen for hepatocytes	[۷٤]
keratinocyte growth factor-2 (KGF-2)	Vertebrate organogenesis	[۱۱۷]
Human Granulocyte-colony stimulatory factor (HGF)	Hematopoietic growth factor	[٤]
Human bone morphogenetic protein-6 (BMP-6)	Osteogenesis	[۳۲]
Antigen ligA and lipL32 of leptospira	Leptospirosis vaccine candidate	[٤٦]

جدول ۱. معرفی تعدادی از پروتئین های نوترکیب تولید شده در مخمر P. pastoris. ستون اول نام پروتئین نوترکیب ذکر شده و در ستون دوم عملکرد پروتئین نوترکیب نشان داده شده است.

Pichia Pastoris یک مخمر متیلوتروف:

جنس های محدودی از مخمر شامل *Hansenula, Candida, Trulopsis* و *Pichia* در بین جنس های مختلف آن در مسیرهای متابولیک سلولی خود از متانول به عنوان تنها منبع کربنی مورد نیاز استفاده می کنند (۳۶)، که از آنها با نام مخمرهای متیلوتروف یاد میشود. استفاده از متانول با هدف تنظیم بیان ژنهای مخمرهای متیلوتروف در سطح رونویسی، می تواند در کنترل سرعت و میزان سنتز آنزیم های تولیدی موثر واقع شود (۶۲). وجود قویترین پروموترهای کنترل کننده بیان در ژن های مخمری، یک پتانسیل حداکثری

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

را برای تولید صنعتی پروتئینهای نوترکیب از طریق القای قابل تنظیم متانول فراهم کرده است (۲۳،۳۴). به عنوان یک مثال، مشتقات حاصل از ژن الکل اکسیداز (AOX1) با استفاده از مسیر متانول، منجر به شناخت پروموتر AOX1 شده است که به عنوان یکی از قوی ترین پروموترهای تنظیم کننده یوکاریوتی معرفی می شود. متابولیسم متانول در مخمرهای متیلوتروف با هدف تنظیم بیان ژن، از طریق اکسیداسیون آن به فرمالدهید و پراکسید هیدروژن (H2O2) توسط آنزیم الکل اکسیداز انجام میپذیرد (۲۲). این واکنش به دلیل جلوگیری از آسیب های وارده توسط پراکسید هیدروژن، درون یک اندامک سلولی بنام پر اکسی زوم انجام می شود(۲۳). میزان افینیتی آنزیم الکل اکسیداز نسبت به اکسیژن ناشی از تجزیه پر اکسید هیدروژن بسیار کم است بنابراین مخمر بیان ژن AOX1 را افزایش می دهد (۳۴). این فرایند مهم سلولی در مخمر به منظور استفاده از پروموتر ژن AOX1 برای بیان پروتئین های نوترکیب پیشنهاد میشود (۳۴،۲۴). طیف گسترده ای از پروتئین های نوترکیب با استفاده از این پروموتر در عملکرد های متنوع از ۵،۱ گرم بر لیتر (یک پیش ساز انسولین)(۱۱۵) تا۲۰-۳۰ گرم بر لیتر (۷۸) تولید شده اند. مخمر *P. pastoris* در حالت رویشی به صورت هاپلوئید وجود دارد و در صورت محدودیت نیتروژن منجر به تکثیر جنسی و تشکیل سلول دیپلوئید می شود. از آنجا که این مخمر به صورت هموتال می باشد انجام کراسینگ ژنتیکی جهت تشکیل سویه جدید، نیازمند نشانگر مکمل برای رشد انتخابی سلول دیپلوئید می باشد (۵۷). سرعت در تراکم بالای رشد مخمرها، یکی دیگر از دلایلی است که کاربرد مخمرهای متیلوتروفیک را در حوضه ی صنعت بسیار افزایش داده است (۷۱،۳۷). از طرف دیگر تولید پروتئین ها با پیوند دی سولفیدی زیاد یا پروتئین های گلیکوزیله یا فسفریله شده، برداشته شدن متیونین از انتهای آمینی پروتئین، اولیگومریزه شدن پروتئین هدف و ترشح آن در حالت محلول به محیط کشت، بخوبی در سیستم میکروارگانیسم *Pichia Pastoris* اثبات شده است (۸۴،۱۲۰).

مخمر *Pichia pink* در مقایسه با *Pichia pastoris*:

سویه های *P.pink*، مخمرهای موتاسیون یافته از *P.pastoris* هستند که جهت تولید سطح بالایی از پروتئین های نوترکیب برای سطوح آزمایشگاهی و صنعتی طراحی شده اند (۶۱). این مخمرها متیلوتروفیک هستند بطوریکه می توانند از متانول بعنوان تنها منبع کربن استفاده کنند. مخمرهای متیلوتروفیک علاوه بر دارا بودن مزایایی از جمله سطح بالای بیان، محیط کشت ارزان، عدم نیاز به سرم، سهولت در افزایش مقیاس تولید و القاء کنترل شده، می توان به پردازش پس از نسخه برداری و ترجمه در این سیستم یوکاریوتی اشاره نمود که این سیستم را برای تولید بالای پروتئین های نوترکیب یوکاریوتی منحصربفرد می سازد (۲۷،۷۰،۱۷). تمام سویه های *P.pink* فاقد ژن کد کننده آدنین هستند، بنابراین این سلولها نمی توانند روی محیط کشت های حداقل یا فاقد آدنین رشد نمایند (۶۱). علاوه بر این، فقدان ژن ADE2 هنگام رشد مخمر موجب افزایش پیش سازهای نوکلئوتیدهای پورین در واکوئل های سلولهای مخمر می گردد (۷۰) و نتیجه ی آن حضور کلنی های صورتی رنگ می باشد. این در حالی است که سلولهای مخمر دارای این ژن، هنگام کشت روی محیط های حداقل یا فاقد آدنین، کلنی های سفید رنگ ایجاد می نمایند. در یک مقایسه کلی، مخمر *P.pastoris* توانسته موفقیت زیادی در تولید بیشتر پروتئین های نوترکیب ایجاد نماید (۳۹-۱۱۲)، با این وجود هنوز پتانسیل افزایش و تقویت سیستم بیانی مخمر *P.pastoris* حائز اهمیت است که می تواند در تولید حداکثری پروتئین هدف مورد توجه قرار گیرد.

سیستم بیان پروتئین نوترکیب در مخمر *Pichia Pastoris*:

مهندسی ژنتیک به عنوان یک ابزار نوین در تولید پروتئین های نوترکیب توانسته است میزان زیادی از نیازهای صنعت را فراهم نماید (۲۹). مخمر *Pichia pastoris* به عنوان یک یوکاریوتی، بسیاری از مزایای سیستم های بیان یوکاریوتی مانند پردازش پروتئین، فولدینگ پروتئین، و تغییرات پس از ترجمه را دارا می باشد (۳۰)، این در حالی است که به سادگی مانند باکتری E. coli و یا ساکارومیسس سرویزیه قابل دست ورزی می باشد (۱،۲،۳). سیستم بیان مخمر *Pichia pastoris*، سریع تر، آسان تر و ارزان تر برای استفاده نسبت به دیگر سیستم های بیان مانند baculovirus و یا کشت بافت پستانداران می باشد و به طور کلی سطوح بالاتری از بیان را نیز نشان می دهد (۲۵).

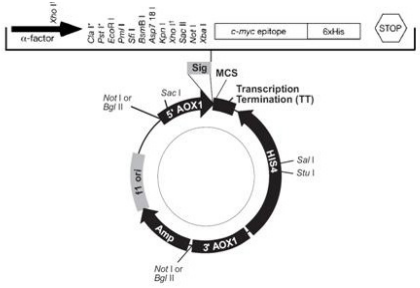
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

به عنوان مثال تولید پروتئین به صورت اینکلوژن بادی یا فولد شدن نامناسب پروتئین به عنوان یک مشکل در سیستم بیان باکتریایی تلقی می شود (.۴۹) در یک مقایسه دیگر، سیستم بیانی مخمر *P. pastoris* با دستکاری مولکولی و ژنتیکی قادر است که به میزان 10 تا 100 برابر، سطح بیان پروتئین هترولوگ را نسبت به مخمر ساکارومیسس سرویزیه افزایش دهد (۱۱). اضافه بر این سیستم بیان *P. pastoris* به صورت کیت بیان برای استفاده تحقیقاتی از شرکت Invitrogen در دسترس می باشد (۵۶). با توجه به مطالعات انجام شده اولین پلی پپتید درمانی بیان شده توسط *P. pastoris* ، با نام ecallantide (۶۰ اسید آمینه) توسط FDA در سال ۲۰۰۹ مورد تایید قرار گرفت (۱۳۱) و توسط شرکت Dyax (کمبریج، MA) به منظور درمان آنژیوادم ارثی تولید شد.

۵-۱ ویژگی ها و خصوصیات وکتور بیانی:

تعداد زیادی از وکتورهای تجاری جهت بیان پروتئین های خارجی در *P. pastoris* وجود دارد که امروزه با توجه به هدف مورد نظر در حال استفاده می باشد. در تصویر ۱ یک نمونه از وکتور بیانی نشان داده شده است. از آنجا که برخی از وکتورها شامل یک توالی کدکننده از سیگنال ترشحی در بالادست ناحیه سایت کلونینگ چندگانه (Multiple coloning site) نمی شود، این وکتورها را می توان برای ترشحات داخل سلولی استفاده نمود (۹۳). البته این نکته قابل ذکر می باشد که کلونینگ پروتئین مورد نظر همراه با سیگنال ترشح مادری در وکتور می تواند در بیان خارج سلولی نقش داشته باشد. وکتورهای دیگر شامل یک توالی کدکننده از توالی سیگنالی مانند alpha-mating factor (α-MF) و سیگنال ترشحی Phosphatase (PHO1) می باشد که نتیجه آن در ترشح ژن مورد نظر می باشد. نسل اول از وکتورهای بیانی در *P. pastoris* (مانند pHIL-D2 or pPIC9) شامل ژن هیستیدین دهیدروژناز (HIS4) می باشند که می تواند به عنوان یک نشانگر انتخابی از طریق ترانسفورماسیون به *P. pastoris* ادغام شود (۷۳). به منظور دستیابی به سطح بیان بالایی از پروتئین مورد نظر در ترانسفورمنت های +His، نیاز به آزمایشات و تحقیقات بیشتر از طریق ادغام چند نسخه ای کاست بیان می باشد (۲۵). در نتیجه وجود یک ژن مقاومت به آنتی بیوتیک برای تولید وکتور pPIC9K مورد استفاده قرار گرفت. این روش اجازه می دهد تا ترانسفورمنت های +His که دارای مقاومت به سطح بالایی از آنتی بیوتیک می باشند انتخاب شده که شامل نسخه های متعددی از وکتور بیان باشند (۹۵). یکی از خصوصیات عمده مشترک در وکتورهای بیانی مخمر *P.pastoris* حضور یک کاست بیانی است که متشکل از توالی پروموتر (عمدتا پروموتر AOX1)، توالی خاتمه رونویسی (مشتق شده از AOX1) و بین آنها ناحیه single یا multiple کلونینگ سایت برای ورود ژن خارجی میباشد. توالی خاتمه رونویسی در ناحیه ی ۳´ از طریق پلی آدنیلاسیون مولکول mRNA را سازماندهی می کند که در فرایند بیان مخمری اهمیت ویژه ای دارد (۵۰). طراحی کاست بیانی به منظور ایجاد محصولات رونویسی Cap-AOX1 5´ UTR-ORF-3´ UTR-PolyA با هدف تشکیل ساختار mRNA بالغ صورت می گیرد که بایستی دارای توالی های رمزکننده باشد به طوریکه سلول مخمر توانایی تولید mRNA پایدار با بهره بری ترجمه کارا را داشته باشد (۹۳). ورود یک توالی کد کننده خارجی به داخل وکتور بیانی معمولا در *E.coli* نیز انجام می شود (۶۳، ۷۹، ۱۱۱). بنابراین همه وکتورهای بیانی *P.pastoris* به صورت شاتل وکتور (*E.coli/P.pastoris*) طراحی شده اند. از طرف دیگر کاست بیانی آنها همچنین محتوی یک منشاء همانندسازی برای حفظ پلاسمید در باکتری همراه با مارکرهای انتخابگر برای ترانسفورماسیون وکتور در هر دو ارگانیسم است. در برخی موارد، وکتورها محتوی یک فراگمنت منشاء گرفته از توالی 3´ AOX1 میباشند که می تواند همراه با توالی پروموتر AOX1 برای انجام جایگزینی ژن AOX1 استفاده شود (۷۱). در کل پروموتر AOX1 جهت بیان پروتئین نوترکیب مورد نظر در وکتورهای بیانی *P.pastoris* نیازمند اجزایی می باشد که در جدول ۲ به تفصیل بیان شده است.



تصویر ۱. شکل شماتیک از وکتور بیان *P. pastoris* که بیانگر قسمتهای مختلف می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

جدول ۲. اجزای موجود در وکتور بیان *P. pastoris* و توصیف نقش آنها

مزیت	توصیف	ویژگی
اجازه دادن متانول القایی برای بیان در سطوح بالا از Pichia و تلفیق پلاسمید هدف به لوکوس AOX1	یک قطعه bp ~ ۱۰۰۰ حاوی پروموتر AOX1	5 ‘AOX1
پروتئین های مطلوب هدف برای ترشح	توالی DNA کد کننده برای یک سیگنال ترشحی پروتئین N ترمینال.	Sig
محل تلفیق ژن مورد نظر به وکتور بیان	سایت چندگانه کلون	MCS
انجام عملیات ختم رونویسی و پلی آدنیلاسیون mRNA	سیگنال انتهای رونویسی و سیگنال پلی آدنیلاسیون از ژن AOX1 (~260 bp)	TT
ترشح پروتئین نوترکیب	سیگنال ترشحی	a-Mating Factor
یک نشانگر انتخابی برای جداسازی سویه های نوترکیب Pichia	نوع وحشی ژن Pichia برای هیستیدینول دهیدروژناز (~۲,۴ kb) و قابل استفاده برای نژادهای Pichia his4	HIS4
تلفیق پلاسمید هدف به لوکوس AOX1	توالی از ژن AOX1 با فاصله نسبتا زیاد به توالی TT (~650 bp)	3´ AOX1
مارکر انتخابی	ژن مقاومت به آمپلی سیلین	Amp
عمل همانندسازی و حفاظت در باکتری	نقطه شروع همانند سازی در E. Coli	$_{P}$BR322 origin
تکثیر DNA تک رشته ای برای انجام موتاسیون	ناحیه f1 به عنوان نقطه شروع همانندسازی در باکتریوفاژ	f1 origin
خطی شدن وکتور جهت تلفیق در ژنوم Pichia	مکان های اختصاصی برش برای آنزیم های محدود کننده	Not I Bgl II Sac I Sal I Stu I

۲-۵ پروموترهای کاربردی در وکتورهای بیانی *Pichia pastoris*

در مخمر *P. pastoris* دو ژن جهت کد کردن پروتئین الکل اکسیداز با نام های AOX1 و AOX2 وجود دارد. محصول ژن AOX1 برای اکثر فعالیت های الکل اکسیداز در سلول مورد استفاده قرار می گیرد (۲۳). بیان ژن AOX1 به شدت تحت تنظیم و کنترل متانول می باشد به طوریکه بالغ بر 30 درصد از کل پروتئینهای محلول در سلول در اثر حضور متانول بیان می شوند. این در حالی است که AOX2 در حدود 97٪ با AOX1 همولوگ می باشد اما بیان آن در حضور متانول بسیار کندتر از بیان ژن AOX1 می باشد (۲۳، ۶۸). در مورد بیان ژن AOX1 این نکته قابل ذکر است که در تنظیم آن در سطح رونویسی نیازمند یک فرایند ۲ مرحله ای است که شامل فرایند مهار/ رهاسازی و یک مکانیزم القاء می باشد (مانند ژن GAL1 در ساکارومیسس) (۵۹،۱۱۰). این در مخمرهای رشد یافته در حضور متانول، حدود ۵٪ از polyA + RNA از طریق بیان ژن AOX1 می باشد. به طور خلاصه، رشد در برابر گلوکز با وجود حضور القاگر متانول سبب مهار رونویسی شده، به همین دلیل برای القاء مطلوب با متانول، رشد بر روی گلیسرول قابل توصیه می باشد (۶۲،۸۳،۱۲۹)، البته رشد در حضور تنها گلیسرول به عنوان یک عامل رها ساز برای بیان حتی سطوح پایین از بیان ژن AOX1 قابل توصیه نیست و حضور متانول جهت القاء لازم است (۳۴،۶۸). اگر چنانچه فعالیت ژن AOX1 از دست رود و بیان الکل اکسیداز سلولی دچار نقصان شود نتیجه ی آن ایجاد یک نژاد فنوتیپی Mut^S (Methanol utilization slow) می باشد که به صورت - Mut نمایش داده می شود. این سلولهای مخمر قادر به استفاده متانول جهت بیان ژن نمی باشند (جدول. ۳). علاوه بر این، سلول ها با نماد + Mut اشاره به نوع وحشی سویه های مخمری دارد که از متانول به عنوان تنها منبع کربن استفاده می کنند (۲۳،۶۸). جدول ۳. ویژگی های ارزیابی شده برای نژاد های فنوتیپی مختلف از *P.pastoris* . در ستون اول نوع فنوتیپ، در ستون دوم انواع مختلف ژن AOX، در ستون سوم میزان متانول باقی مانده در محیط، ستون چهارم نرخ اختصاصی رشد در ساعت و در ستون آخر نرخ تغذیه متانول ذکر شده است.

جدول ۳. مشخصات سویه های مختلف مخمر ***P. pastoris***

Strain type	AOX gene	Residual methanol (%)	Specific growth rate (h^{-1})	Methanol feeding rate
Mut^+	AOX_1^+ AOX_2^+	<0.5	0.14	+++
Mut^S	AOX_1^- AOX_2^+	0.2-0.8	0.04	++
Mut^-	AOX_1^- AOX_2^-	0.5	0	-

در مواردی که پروموتر AOX1 مناسب نباشد پروموترهای دیگر شبیه GAP، FLD1، PEX8 و YPT7 استفاده می شوند (۷۰) (جدول. ۴). در مورد پروموتر GAP باید گفت که از ژن گلیسرآلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز مخمر مشتق شده است. مزیت استفاده از این پروموتر این است که متانول برای القای آن لازم نیست و برای استفاده از یک منبع کربن دیگر نیازی به تغییر کشت نمی باشد (۱۱۸). علاوه بر این، رشد سویه و بیان ژن را مرسوم تر، آسان تر و مستقیم تر می سازد. پروموتر GAP برای کاربردهای مختلف استفاده می شود که از آن جمله، به دلیل عدم حضور القاگر متانول، به منظور تولید محصولات در صنایع غذایی کاربرد دارد. در سیستم بیانی GAP، پروتئین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

هترولوگ کلون شده همراه با رشد سلول بیان می شود (۲۱) که این سیستم نیاز به هیچ شستشو برای برداشتن منبع کربن غیر متانول ندارد و بنابراین سیستم بیان GAP ممکن است به میزان قابل توجهی برای گسترش روش های مقرون به صرفه جهت تولید مقیاس بزرگ از پروتئین های هترولوگ استفاده شود (۱۱۳). برای بیان پروتئین های نشاندار شده جهت مطالعات NMR از کشت محدود به منبع کربن تک استفاده می شود که به دلیل پیوستگی بیان پروموتر GAP، این پروموتر یک انتخاب خوب برای تولید پروتئین هایی که ممکن است برای مخمر سمی باشند نیست (۱۲۶). پروموتر FLD1 از آنزیم گلوتاتیون وابسته به دهیدروژناز فرمالدهید از مخمر *P.pastoris* مشتق شده است که توسط متانول به عنوان منبع کربن و آمین های الکیلی مانند متیل آمین به عنوان منبع نیتروژن القا می شود (۹۷). بنابراین پروموتر FLD1 انعطاف پذیری بالایی از القای بیان پروتئین با متیل آمین که یک منبع نیتروژن ارزان است را نشان می دهد. پروموترهای PEX8 (۶۰) و YPT1 (۹۵) در مواقعی که سطح بیان متوسط مورد نیاز است به کار برده می شوند. ژن PEX8 یک پروتئین ماتریکس پروکسی زومال را کد می کند که مورد نیاز برای تکامل پراکسی زوم می باشد. شواهد حاکی از آن است که سطح بیان در پروموتر PEX8 با القا متانول به طور قابل توجهی پایین تر از پروموترهای FLD1 و AOX1 است. در صورتی که ژن YPT1 یک GTPase درگیر در ترشح را کد می کند. این پروموتر یک سطح پایین اما پیوسته از بیان را در محیط محتوی گلوکز، متانول یا مانیتول به عنوان تنها منبع کربن YPT1 فراهم می کند (۹۵). پروموتر ترکیبی AOX1 و GAP یکی دیگر از انواع پروموترهاست که برای بیان همزمان پروتئین های نوترکیب گسترش یافته و از طریق افزایش سطح بیان پروموتر GAP صورت می گیرد (۱۲۱). متانول در القای پروموتر GAP و القای پروموتر AOX1 نقش مهمی را ایفا می کند که در صورت عدم وجود گلوکز، میزان اثر آن در تولید پروتئین ترشحی مورد نظر به میزان ۲ برابر در پروموتر GAP بیشتر از پروموتر AOX1 می باشد. اخیرا در طی روند ترانسفورماسیون از الکتروپوریشن بخاطر آسانی آن و لیتیوم استات برای صرفه جویی در هزینه های آن استفاده می شود (۱۰۵). علاوه بر این، مارکرهای انتخابی نه تنها جهت گزینش ترانسفورمانت ها استفاده می شوند، بلکه برای اطمینان از بقاء پلاسمید در طی روند تناوب نسل استفاده می شوند. از مارکرهای انتخاب غالب می توان به ژن های مقاومت به مس (۳۵) و برخی از آنتی بیوتیک ها شامل کلرامفنیکل (۵۸)، هیگرومایسین (۴۰) و زئوسین (۸۸) اشاره نمود. مارکرهای انتخابی اکسوتروف شامل HIS3، HIS4، LEU2، LYS2 ، TRP1 و URA3 برای تکمیل یک موتاسیون آکسوتروف خاص در سویه میزبان طراحی می شوند که برای مخمر P.pastoris ژن های HIS4 و مقاومت به زئوسین معمولا استفاده می شوند (۴۰،۸۸).

جدول ٤. پروموترهای کاربردی در مخمر *Pichia pastoris*.

Promoter	Regulation	Reference
AOX1	Inducible (methanol)	[۱۱۰]
FLD1	Inducible (methanol, methylamine)	[۹۷]
GAP	Constitutive	[۹۷]
PEX8	Inducible (methanol, oleate)	[۶۰]
YPT1	Constitutive	[۹۵]

۵-۳ سیگنال پپتید:

پروتئین های نوترکیب از طریق سیگنال پپتید می توانند از مسیر ترشحی عبور کنند و دچار تغییرات بعد از ترجمه شوند که ممکن است برای عملکرد پروتئین ضروری باشد (۵۴). مطالعات Plantz و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده است که بالغ بر ۵۰۰ پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی مخمر *P. pastoris* تولید شده است (۸۹) که توسط سیگنال پپتید به درون محیط انتقال داده می شود. مزیت عمده برای بیان پروتئینهای هترولوگ به عنوان پروتئین های ترشحی در مخمر *P. pastoris* این است که سطوح بسیار پایین از پروتئین های بومی نسبت به پروتئینهای هترولوگ در مخمر *P. pastoris* ترشح می شوند (۷۵). از آنجایی که در محیط کشت رشد حداقل *Pichia*، میزان کم پروتئین وجود دارد این بدان معنی است که ترشح پروتئین هترولوگ شامل اکثریت قریب به اتفاق از کل پروتئین می باشد که به عنوان اولین گام در تخلیص پروتئین قابل ذکر می باشد (۶). علاوه بر این، ترشحات خارج سلولی، از اثرات زیان آور بیان بیش از حد پروتئین های داخل سلولی پیشگیری می کند (۶۵). در برخی از موارد، ازآنجایی که *P. pastoris* به عنوان یک سیستم بیانی وسیع مورد استفاده قرار گرفته است، توالی سیگنال کوتاه جهت ترشح کارآمد پروتئین های

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

نوترکیب به کاربرده می شود. از آنجایی که کارایی پپتیدهای سیگنال ترشحی می تواند در ترشح پروتئین های نوترکیب متفاوت باشند، تنوع دسترسی به سیگنال های پپتیدی اهمیت زیادی دارد. از طرف دیگر، برای شناسایی سیگنال ترشحی بهینه در هر پروتئین نوترکیب، غربالگری سیگنال پپتید برای بالاترین ظرفیت ترشح می تواند انجام شود (۶۷). Brockmeier و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۹) یک کتابخانه سیگنال پپتیدی ایجاد کردند که می تواند یک ابزار قدرتمند برای بهینه کردن ترشح پروتئین نوترکیب در باکتری گرم مثبت باشد.

سیگنال پپتیدها با کارکرد انتقال پروتئین را می توان به دو دسته مجزا شامل همزمان با ترجمه (Cotranslational) و پس از ترجمه (Posttranslational) تقسیم کرد که در مورد اولی، پیش پروتئین همزمان با عمل ترجمه به شبکه آندوپلاسمی انتقال داده می شود (۷،۶۴). اما در Posttranslational، پیش پروتئین به طور کامل سنتز می شود و از ریبوزوم قبل از انتقال به شبکه آندوپلاسمی آزاد می شود (۱۰) به عنوان مثال، a-Mating Factor Leader (a-MF) به عنوان یک سیگنال پپتید posttranslational طبقه بندی می شود (۸۱). در مسیر پس از ترجمه، سنتز کامل پروتئین در سیتوپلاسم می تواند مشکلاتی را برای پروتئین های خاصی به همراه داشته باشد. پلی پپتیدهای تازه ساخته شده باید در یک ساختار unfold یا تا حدی فولد، قبل از انتقال از طریق غشای شبکه آندوپلاسمی حفظ شوند (۸۶). اما این امکان وجود دارد که برخی پلی پپتیدها به صورت misfold مانده و تجمع یابند و حتی فولد شدن در سیتوپلاسم به حالت اصلی خود نیز صورت گیرد، که این مانع شناسایی توالی سیگنال پپتیدی و انتقال آن از طریق پروتئین ترانس لوکان Sec61 می شود (۱۰۸). اگرچه در بعضی موارد از فولدینگ و تشکیل باندهای دی سولفیدی به عنوان یک قدم محدودکننده در تولید پروتئین های خارجی یاد می شود (۵۱). مطالعات حاکی از آن است که توالی a-Mating Factor Leader در بسیاری از وکتورهای بیانی مخمر *P. pastoris* به طور گسترده برای ترشح پروتئین های هترولوگ استفاده می شود (۲۷). علاوه بر این یک توالی سیگنالی اسید فسفاتاز (PHO1) در مخمر *P. pastoris* شناسایی شده (۱۷) که قادر بوده است پروتئین پوشش G2 از ویروس HanTaan را به محیط کشت سویه KM71 از مخمر *P. pastoris* (۴۲) ترشح کند. اگرچه مطالعات نشان دادند که استفاده از a-MF به عنوان سیگنال پپتید حتی می تواند منجر به ترشح مقدار بالاتری از پروتئین نوترکیب شود اما استفاده از سیگنال پپتید بومی پروتئین مورد نظر و جستجو برای توالی سیگنال پپتید ترشحی با کارایی بالا نیز نباید نادیده گرفته شود (۲۸). به عنوان یک مثال دیگر، توالی سیگنال فیتوهماگلوتینین (PHA-E) در لوبیای فازئولوس ولگاریس شناسایی شده است (۹۰) که این توالی سیگنالی به جای توالی سیگنال a-MF برای ترشح فیتوهماگلوتینین، snowdrop lectin و پروتئین فلورسانس سبز مورد استفاده قرار گرفته است (۹۰). اخیرا یک آنالیز پروتئومیک از پروتئین های ترشح شده توسط یک سویه وحشی *P. pastoris* تحت القای متانول انجام شده است (۵۳). در این مطالعه ۳۷ پروتئین با خاصیت ترشحی طبیعی گزارش شده است که می توانند کاندیدای خوبی برای غربالگری سیگنال پپتیدها برای ترشح پروتئین در *P. pastoris* باشند.

۵-۴ دوز ژنی:

تعدادی از عوامل به طور بالقوه می تواند در نتیجه بیان پروتئین هترولوگ در *P. pastoris* تاثیر بگذارد که از آن جمله می توان به خواص توالی نوکلئوتید (به عنوان مثال ترکیب کدون ، محتوای AT و ساختار ثانویه)، نحوه الحاق توالی به ژنوم، انتخاب سویه های میزبان، نحوه بیان، استفاده از متانول و شرایط کشت اشاره کرد (۱۷،۱۰۲). با این حال می توان اظهار داشت که بیان پروتئین از تنها یک نسخه ژن نوترکیب، یک عامل محدود کننده در تولید پروتئین است. از این رو پیشنهاد شده است که قرار دادن چند نسخه ژن نوترکیب می تواند با هدف به دست آوردن حداکثر بازده پروتئین انجام شود (۹۴). علاوه بر بهینه سازی کدون ژن هترولوگ، تعداد کپی ژن یکی از پارامترهای مهم به شمار می رود که باید در هنگام بیان و ترشح پروتئین نوترکیب در *P. pastoris* مورد ارزیابی قرار گیرد. در مخمر *P. pastoris*، ادغام کاست بیان به داخل ژنوم ارگانیسم یک روش بسیار کارامد تلقی می شود که سبب تشکیل یک کلون بسیار پایدار شده و نیاز به فشار ثابت انتخاب را حذف می کند. با استفاده از این روش می توان گونه های که حاوی یک یا چند نسخه از کاست بیانی هستند را تولید کرد (۱۳۰). مطالعات

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

انجام شده حاکی از آن است که سویه های حاوی نسخه های متعدد از کاست بیان، اثر مثبتی بر ترشح پروتئین نوترکیب دارند (۷۶،۷۷،۱۳۰) که در جدول ۵ به بعضی از آنها اشاره شده است.

جدول ۵.ژنهای الحاق شده در کاست بیان مخمر *P. pastoris* و میزان اثر آن در نرخ پروتیئن ترشحی.

gene name	No. copies of the expression cassette	Explaination	Reference
miniproinsulin (MPI)	11	Increase MPI production from 19 to 250 mg/L of secreted protein	[۷۶]
human serum albumin and the ribosomal DNA locus	1	For low gene copy numbers	[۷۷]
porcine insulin precursor (PIP)	12	The highest PIP yield in culture supernatants	[۱۳۰]

به طور کلی، سویه هایی که محتوی کپی های اینتگره شده فراوان از یک کاست بیانی می باشند اغلب نسخه های متعددتری از پروتئین خارجی را نسبت به سویه های تک نسخه ای تولید می کنند(جدول. ۵). بنابراین بعد از اینکه یک نسخه کپی از ژن مورد نظر در سویه *P. pastoris* جهت تولید مقدار قابل توجهی پروتئین فعال از نظر بیولوژیکی با اندازه صحیح وارد شد، بهتر است جهت افزایش تعداد نسخه های ژن مورد نظر به بررسی و ساخت سویه های کارامد بپردازیم. روشهای مختلفی برای تولید سویه های بیانی با کپی فراوان در مخمر *P.pastoris* وجود دارد که در زیر به سه روش اصلی اشاره می کنیم. در روش اول، یک وکتور با کپی های فراوان دم-سر از یک کاست بیانی ساخته می شود (۲۸). روش دوم مستلزم استفاده از یک وکتور بیانی در مخمر *P. pastoris* است که محتوی هر دو ژن HIS4 و ژن مقاومت به کانامایسین باکتریایی KanR می باشد، که علاوه بر این، مقاومت به آنتی بیوتیک یوکاریوت G418 را سبب می شود (۷۷،۱۰۶). روش سوم استفاده از یک وکتور حمل کننده ژن sh ble باکتریایی است که مقاومت به آنتی بیوتیک زئوسین را به دنبال دارد (۱۰۶). زئوسین از طریق ورود به داخل DNA باعث مرگ سلولی می شود. مقاومت به زئوسین توسط محصول ژن sh ble ایجاد می شود که با اتصال به آنتی بیوتیک آن را غیر فعال می کند (۱۰۶). در نهایت سویه های بیانی با نسخه های فراوان این سه نوع روش گزینش می شوند و جهت تولید پایدار در کشت فرمانتور مورد ارزیابی قرار می گیرند.

۵-۵ گلیکوزیلاسیون:

گلیکوزیلاسیون فراوان ترین تغییر در حال اتفاق در همه ی سلسله های موجودات زنده است (۶۹) و ممکن است که محلولیت، فولدینگ، حساسیت به پروتئولیز، پایداری، اتصال به رسپتور و فعالیت در شرایط in vivo پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد (۳۱،۱۲۴). تقریبا تمام پلی پپتیدهای رها شده در یوکاریوت ها گلیکوزیله هستند به طوریکه گلیکوزیلاسیون با توجه به نوع گونه، بافت و سلول متفاوت است (۸۴). حدود ۷۰ درصد از پروتئین های درمانی را گلیکو پروتئین ها تشکیل می دهند بنابراین گلیکوزیلاسیون صحیح پروتئین ها در کارایی پروتئین بسیار مهم می باشد چرا که گلیکوزیلاسیون غیر انسانی می تواند نیمه عمر پروتئین را کاهش دهد و یک پاسخ ایمنوژنیک نسبت به کربوهیدرات خارجی ایجاد نماید (۴۷). در برخی موارد، یک پروتئین به طور معمول بدون گلیکوزیله فعال است که γ- اینترفرون یکی از آنها می باشد (۹۲). در مواردی که گلیکوزیلاسیون برای پایداری و یا فولدینگ مناسب لازم است (به عنوان مثال، اریتروپویتین و کوریونی گنادوتروپین انسانی)، عمل گلیکوزیلاسیون اغلب می تواند توسط مخمر *P. pastoris* انجام شود (۴۴). عمل گلیکوزیلاسیون در توالی اولیه پروتئین در سایت (Asn-X-Ser/Thr) رخ می دهد و پروتئین ترشح شده پستانداران از طریق اتصال کووالانسی قند D-مانوز با آسپاراژین متصل به -Nاستیل D-glucosaminemolecules- گلیکوزیله می شوند (۶). آنزیم های قارچی نیز اغلب به همین نوع گلیکوزیله می شوند، اگر چه گاهی اوقات کربوهیدرات اضافی متصل شده به اکسیژن موجود در سرین یا ترئونین در پروتئین قارچی مشاهده می شود (۸۲). در یوکاریوت ها گلیکوزیلاسیون پروتئین ها به صورت شایع بعد از عمل ترجمه و قبل از ترشح می باشد، اما تفاوت های مهمی بین یوکاریوت ها در نوع قندهای اضافه شده در طول گلیکوزیلاسیون وجود دارد. برای مثال *P. pastoris* قادر به اضافه کردن هر دو بخش O و N کربوهیدرات به پروتئین های ترشحی است (۳۸). برخلاف سلولهای پستانداران، که الیگوساکاریدهای اتصال O عمدتا متشکل از سیالیک اسید، گالاکتوز و N استیل گالاکتوز آمین هستند، در *P. pastoris* الیگوساکاریدهای اتصال O تنها از باقیمانده مانوز ساخته

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

شده و اضافه می شوند (۴۴). جایی که اکثر یوکاریوت ها، الیگوساکاریدهای اتصال O را بروی گروههای هیدروکسیل از ترئونین و سرین اضافه می کنند، *P. pastoris* نمی تواند دارای اسید آمینه ترجیح داده شده برای گلیکوزیلاسیون باشد. پروتئین های گلیکوزیله با پتانسیل بالایی در مخمر *P. pastoris* تولید می شوند (۱۹،۱۱۴)، اما تولید گلیکوپروتئینهای درمانی در این سیستم به دلیل تفاوت در بیوسنتز کربوهیدرات متصل به پروتئین نسبت به ارگانیسم هدف یعنی انسان مختل شده است (۴۳). با این وجود، پیشرفت های بزرگی در مهندسی سویه *P. pastoris* با گلیکوزیلاسیون N انسانی کامل با استفاده از اصلاحات در دسترس از مسیرهای گلیکوزیلاسیون مخمر ساکارومیسس سرویزیه صورت گرفته است که سبب تبدیل گلیکانهای مانوز نوع مخمری به گلیکانهای مانوز نوع انسانی شوند (Callewaert.(۸،۱۴،۴۳ و همکاران (۲۰۰۱) (۱۴) یک ۱،۲-الفا-D-مانوزیداز از *Trichoderma reesei* که مورد هدف شبکه آندوپلاسمی بود با ۲ گلیکوپروتئین شامل هماگلوتینین از ویروس آنفولانزا و ترانس سیالیداز از تریپانوزوم کروزی هم بیان کردند. نتایج حاصل از آنالیز N- گلیکانهای موجود در هر دو پروتئین خالص شده نشان داد که یک کاهش بالای ۸۵٪ در تعداد باقیمانده اتصال آلفا ۱و۲ مانوز وجود دارد و الیگوساکارید مانوز نوع انسانی Man(5)-GlCNaC(2)، اکثریت N- گلیکان مربوط به ترانس سیالیداز مهندسی شده گلیکو را تشکیل می دهد. در روش دیگر از کتابخانه ژنومی برای انسانی کردن گلیکوزیلاسیون با اتصال N به صورت ترکیبی استفاده شد (۱۹). مسیر ترشحی *P. pastoris* برای انجام واکنش گلیکوزیلاسیون متوالی به صورت ژنتیکی مهندسی شد که بیانگر پردازش اولیه N- گلیکانها در انسان و دیگر پستانداران عالی تر می باشد. بعد از حذف گلیکوزیلاسیون غیر انسانی توسط حذف ژن آلفا- ۱و۶ مانوزیل ترانسفراز از *P. pastoris*، چندین کتابخانه ژنتیک ترکیبی ساخته شد که برای فعال شدن در محل آلفا- ۱و ۲ مانوزیداز و بتا ۱و۲ N – استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز I انسانی (GnT1) در مسیر ترشحی به کاربرده شد. بیان نوترکیب یک پروتئین گزارشگر انسانی در این سویه مهندسی شده منجر به تشکیل یک گلیکوپروتئین با GlcNAC-Man (5)-GlcNAC(2) به عنوان N- گلیکان اولیه می شود. این استراتژی برای مهندسی مخمر جهت انجام گلیکوزیلاسیون پیچیده شبیه انسان (۷۱) یک مهم به شمار می رود. Vervecken و همکاران (۲۰۰۴) (۱۱۴) با غیر فعال کردن ژن OCH1 که مسئول هایپرمانوزیله شدن مخمر برای α-۱-۶ مانوزیل ترانسفراز و انسانی کردن گلیکوزیلاسیون N، عمل مهندسی *P. pastoris* را در این ارگانیسم مورد تایید قرار داد. در مرحله دوم آنها یک آنزیم α- ۱و۲ مانوزیداز موجود در شبکه آندوپلاسمی و دو گلیکوزیل ترانسفراز کایمریک، Kre-2-GnT1 وگالاکتوزیل ترانسفراز Kre2-B-1,4- را به میزان زیاد بیان کردند (۱۱۴) . گروه دیگر توسط Gerngross (۲۰۰۴) موفق در مهندسی سویه های *P. pastoris* برای انسانی کردن گلیکوپروتئین ها شد (۳۹). سویه ها قادر به ترشح کمپلکس سیالیک انتهایی بودند و آنها را یک جایگزینی مناسب برای تولید گلیکوپروتئین ها در لاین سلولی پستانداران می سازد. به عنوان مثال، این گروه یک اریتروپوئتین نوترکیب با عملکرد کامل در مطالعات حیوانی تولید و مورد ارزیابی قرار دادند به طوریکه با شکل فعال بیولوژیکی آن پروتئین قابل قیاس بود. Li و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۷۱) قادر به بهینه کردن تولید IgG انسانی در *P. Pastoris* مهندسی شده قندی بودند که عملکرد موثری را با واسطه آنتی بادی نشان می دهد. در دسترس بودن سویه های *P. pastoris* مهندسی شده، این را یک سیستم بیانی جذاب برای تولید و ترشح پروتئین های نوترکیب می سازد. گلیکوپروتئین های نوترکیب با الگوی گلیکوزیلاسیون صحیح نه تنها مشکلات قابلیت های بالقوه مخمر *P. pastoris* را از بین می برند بلکه اجازه تولید گلیکوپروتئین های درمانی را در این میزبان می دهند.

بهینه سازی فرآیند تخمیر:

تخمیر برای پروتئین های ترشحی بدلیل مرتبط بودن بازده با تراکم سلولی امری ضروری است به طوریکه در برخی موارد، بیان در فرمانتور با افزایش چشمگیری ۱۰ برابری بازده نسبت به فلاسک دیده می شود. پارامترهای عملیات فرآیندهای زیستی، از جمله ترکیبات محیط کشت، دما، PH، میزان استرس و هوادهی و استراتژی های تغذیه می تواند بر عملکرد و کیفیت محصول تاثیر به سزایی بگذارد (۱۵). برای تولید پروتئین های نوترکیب در فرآیندهای تخمیر با تراکم سلولی بالا، به طور

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

گسترده از یک محیط کشت متشکل از نمک های اساسی، محلول نمک ردیاب (PTM1)، هیدروکسید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن (که در آن گروه هیدروکسیل جهت حفظ PH)، و ترکیبات تغذیه ای گلیسرول/متانول که به عنوان منبع کربن و انرژی می باشد استفاده می شود. متانول جهت القا پروموتر AOX1 در سویه های +MUT و Muts استفاده می شود، با این وجود میزان غلظت متانول در کارایی سیستم بیان تاثیر به سزایی دارد چراکه در غلظت بالاتر از ۴ گرم بر لیتر رشد سلول مهار می شود (۴۳) . استراتژی های مختلفی جهت تنظیم موثر غلظت متانول در طی فرایند تغذیه وجود دارد که شامل مراحل مختلف است (۱۲۸،۹۹،۱۰۴). در مرحله اول، نژاد مهندسی شده در محیط حاوی گلیسرول، کشت می شود که منبع کربن را مهار می کند تا سلول ها تجمع یابند. در مرحله دوم، یک گلیسرول تغذیه ای در یک سطح محدود کننده در مرحله گذار به کاربرده می شود تا غلظت سلول را بدون مهار رشد افزایش دهد. یکی دیگر از اهداف مرحله دوم این است که سلولها برای یکی دیگر از منابع کربنی آماده شوند. در مرحله سوم، متانول به محیط تخمیر جهت شروع فاز القایی اضافه می شود. استفاده از گلیسرول یکی از شایع ترین استراتژی های مورد استفاده در فرایند تغذیه مخمر است (۶۲،۸۳،۱۲۹). با این حال، گزارشی مبنی بر اثر مهار کنندگی گلیسرول اضافی با سرکوب پروموتر AOX1 جهت تولید پروتئین نوترکیب ارائه شده است (۱۲۳). بسیاری از مطالعات انجام شده، استفاده از سوربیتول را به عنوان یک جایگزین با گلیسرول در استراتژی تغذیه ای گلیسرول/ متانول پیشنهاد می کنند (۱۳،۱۶،۱۱۶). آزمایشات حاکی از آن است که ترکیب محیط روی رشد و زنده بودن سلول و بیان پروتئین هترولوگ در مخمر تاثیر بسزایی میگذارد، علاوه بر این، عصاره مخمر، کازآمینو اسید یا EDTA سبب تشدید تجمع پروتئین توسط مخمر پاستوریس می شود. تکمیل محیط القا با M۰,۴ ال آلانین، mm۵ ترکیب EDTA یا ۲٪ کازآمینواسید در محیط القای BMMY، تولید scFv را تقریبا ۵-۳ برابر افزایش می دهد و به 25mg/l از scFv عملکردی برسد (۷۱) . از آنجایی که اکسیژن در اکسیداسیون متانول به فرمالدئید به عنوان یک واکنش جانبی استفاده می شود، نرخ انتقال اکسیژن در مسیر استفاده از متانول از اهمیت ویژه ای برخوردار است که منجر به شکل گیری محصول می شود (۹۸). به منظور تنظیم مقدار مورد نیاز از اکسیژن، تمامی موانع مربوط به انتقال اکسیژن به حداقل می رسد و هوای غنی شده از اکسیژن استفاده می شود. در بسیاری از فرآیندهای تخمیر *P. pastoris*، در حدود ۲۰-۳۰٪ اکسیژن محلول حفظ می شود (۱۲۳،۱۶،۵۲،۱۰۷،۱۰۹). بسیاری از فرآیندها درمخمر *P. pastoris* در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انجام می شود که مطلوب برای رشد مخمر است. با کاهش دمای رشد از ۳۰ به ۲۰ درجه سانتی گراد، یک افزایش ۳ برابری در بهره وری خاص R-پروتئین در کشت های chemostat از *P. pastoris* صورت گرفت که با کاهش شار از طریق چرخه TCA، کاهش سطح پروتئین های دخیل در پاسخ استرس اکسیداتیو و سطوح پایین تر سلولی از چاپرون های مولکولی بدست آمد (۳۳) . PH محیط کشت نقش مهمی را در فرآیندهای تخمیر به عهده دارد زیرا سرعت رشد سلول، فعالیت آنزیم، و تخریب پروتئولیتیک، وابسته به pH محیط کشت می باشد. گزارشات نشان می دهد که مقدار pH در محدوده ۳,۵ تا ۵,۵ می تواند اثر کمی بر روی نرخ رشد سویه +Mut از *P. pastoris* داشته باشد (۵۵). برای تولید حداکثری پروتئین های مختلف، pH های بهینه مختلفی وجود دارد (۷۵). به عنوان مثال برای تولید اریتروپویتین در *P. pastoris*، بالاترین حالت تولید محصول در دو مرحله تنظیم PH، شامل مرحله تغذیه گلیسرول با pH = ۵,۰ و فاز القایی متانول در pH = ۴,۵ وجود دارد (۱۰۱) و برای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در *P. pastoris*، بالاترین وضعیت تولید محصول در pH = ۵,۰ می باشد (۱۲) .

نتیجه گیری و چشم انداز آینده:

سیستم های بیانی مختلفی از مخمرها جهت تولید پروتئین های نوترکیب در حال استفاده می باشد. امروزه به دلیل در دسترس بودن سویه های مخمری، تنوع وکتورهای موجود، پروموترها، مارکرهای اگزوتروفیک، پروتوکول های ترانسفورماسیونی در یک واکنش ترکیبی با تکنیک های تخمیری، وجود سیستم های بیولوژیکی و بیولوژیک سنتتیک، تکنولوژی ماکرواری و سرعت گسترش پایگاههای اطلاعاتی، استفاده از مخمرها را به طور چشم گیری در حوضه صنعت و تولید افزایش داده است. مطالعات نشان می دهد که مخمر *P. pastoris* دارای پتانسیل

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

بالایی برای تولید پروتئین های نوترکیب با هزینه کمتر و کارایی بیشتر می باشد که مطالعات تجاری کردن در بیوراکتورهای صنعتی جهت تولید کنترل شده رو به گسترش است. مدل های ریاضی جامعی از متابولیسم مخمر جهت شناسایی، شبیه سازی و یا مهندسی متابولیک مسیرهای تولیدی در سلول های مخمری پیشنهاد شده است (۸۵). نوع مدل برای استفاده بستگی به هدف از مطالعه و همچنین داده های موجود دارد این در حالی است که مدل ژنومی برای *P. pastoris* (۱۰۰) و *S. cerevisiae* (۴۸) در دسترس است. زیست شناسی مولکولی، نیروی محرکه مهمی در جهت تحقیق در مواد دارویی زیستی و تولید سطح بالایی از پروتئین می باشد. صنعت biopharmaceutical به صورت چند وجهی است به طوریکه ریبوزوم ها، مولکول آنتیسنس، آنتی بادیهای مونوکلونال، ژنومیکس، پروتئومیکس، متابولومیکیس، شیمی ترکیبی و بیوسنتز، غربالگری با توان بالا، بیوانفورماتیک، نانوبیوتکنولوژی، ژن درمانی، مهندسی بافت و بسیاری از مسائل دیگر در این ترکیب مهم بیولوژیکی دخیل هستند که اثرات مهم آن در جهان توسط مهندسی ژنتیک نشان داده شده و چهره فارماکولوژی، پزشکی و صنعت را تغییر داده است. در چندین سال آینده باید پیشرفت های مهمی در حل بیماری های حاد مزمن و تولید پیچیده داروهای جدید و واکسن ها، کاهش قابل ملاحظه اثرات آلودگی محیط زیست با استفاده از میکروب های نوترکیب ، و توسعه فرایندهای زیستی نوترکیب برای حل مشکل انرژی که جهان اکنون با آن مواجه است صورت گیرد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

منابع :

(1) Agheli Mansour A, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, Farhadi N. Cloning, high level expression and immunogenicity of 1163-1256 residues of C-terminal heavy chain of C. botulinum neurotoxin type E. Biologicals, 2010; 38(2):260-4.
(2) Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. In silico analysis of chimeric espA, eae and tir fragments of Escherichia coli O157:H7 for oral immunogenic applications. Theor Biol Med Model, 2009;6(28):1-11.
(3) Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA,eae and tir genes of E.coli O157:H7. Vaccine, 2010; 28(42):6923-29.
(4) Apte-Deshpande A, Somani S, Mandal G, Soorapaneni S, Padmanabhan S. Over expression and analysis of O-glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor in Pichia pastoris using Agilent 2100 Bioanalyzer. J biotechnol, 2009; 143(1):44-50.
(5) Banting FG, Best CH, Collip JB, Macleod JJR. The preparation of pancreatic extracts containing insulin. Trans R Soc Chem, 1922;16: 27-29.
(6) Barr KA, Hopkins SA, Sreekrishna K. Protocol for Efficient Secretion of HSA Developed from Pichia pastoris. Pharm Eng, 1992; 12:48-51.
(7) Berndt U, Oellerer S, Zhang Y, Johnson AE, Rospert S. A signal–anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009; 106:1398–403.
(8) Bobrowicz P, Davidson RC, Li H, Potgieter TI, Nett JH, Hamilton SR, et al. Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast Pichia pastoris: production of complex humanized glycoproteinswith terminal galactose.Glycobiology, 2004; 14:757–66.
(9) Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T. Systematic Screening of All Signal Peptides from Bacillus subtilis: A Powerful Strategy in Optimizing Heterologous Protein Secretion in Gram-positive Bacteria. J Mole Biol, 2006; 362:393–402.
(10) Brodsky JL. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. Int Rev Cytol, 1998; 178:277–328.
(11) Buckholz RG, Gleeson MAG. Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Protein. Biotechnology, 1991; 9:1067-72.
(12) Çalık P, Bayraktar E, İnankur B, Soyaslan EŞ, Şahin M, Taşpınar H, et al. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by Pichia pastoris. J Chem Technol Biot, 2010; 85:1628–35.
(13) Çalık P, İnankur B, Soyaslan EŞ, Şahin M, Taşpınar H, Açık E, et al. Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by Pichia pastoris in sorbitol batch and methanol fed-batch operation. J Chem Technol Biot, 2010; 85:226–33.
(14) Callewaert N, Laroy W, Cadirgi H, Geysens S, Saelens X, Min Jou W, et al. Use of HDELtagged Trichoderma reesei mannosyl oligosaccharide 1, 2-alpha-D-mannosidase for Nglycan engineering in Pichia pastoris. FEBS Lett, 2001; 503:173–8.
(15) Çelik E, Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnol Adv 2011; doi:10.1016/j. biotechadv.2011.09.011.
(16) Çelik E, Çalık P, Oliver SG. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by Pichia pastoris. Yeast, 2009; 26:474–84.
(17) Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEMS Microbiol Rev, 2000; 24:45–66.
(18) Chen H, Ren A, Hu S, Mo W, Xin X, Jia W. The significance of tumor necrosis factor-alpha in newly diagnosed type 2 diabetic patients by transient intensive insulin treatment. Diabetes Res Clin Pract, 2007; 75:327–32.
(19) Choi BK, Bobrowicz P, Davidson RC,Hamilton SR, KungDH, Li H, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003; 100:5022–7.
(20) Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, Henwood CA. Production of Epidermal Growth Factor in Yeast: High-level Secretion Using Pichia pastoris Strains Containing Multiple Gene Copies. Gene, 1991; 105:205-12.
(21) Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast Pichia pastoris under different promoter: a review. Microb Cell Fact, 2006; 5:17–38.
(22) Cos O, Resina D, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. Heterologous production of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. Biochem Eng J, 2005;26(2):86-94.
(23) Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill G, Stillman CA. Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast, Pichia pastoris. Mol Cell Biol, 1989; 9:1316-1323.
(24) Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T. Expression in the yeast Pichia pastoris. Guide to protein purification. Second Edition, 2009; 463:169–89.
(25) Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris. Biotechnology, 1993; 11:905–10.
(26) Dale C, Allen A, Fogarty S. Pichia pastoris: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. Biopharm, 1999; 12(11):36–42.
(27) Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit, 2005; 18:119–38.
(28) Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in Pichia pastoris and advances in protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2012; 93:31–9.
(29) Demain AL. The biopharmaceutical revolution. Chem Today (Chim Oggi), 2004; 22:11–2.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

(30) Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv, 2009; 27:297–306.
(31) Dixon B. Enzyme expression. Glycosylation enhances stability. Biotechnology, 1991; 9:418.
(32) Dong M, Shuang Y, Fen H, Jie Z, Yuhuan Q, Jun D, Tianhui Z. Expression and Secretion of Human Bone Morphogetic Protein-6 in Pichia pastoris [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2010; 1:008.
(33) Dragosits M, Stadlmann J, Albiol J, Baumann K, Maurer M, Gasser B, et al. The effect of temperature on the proteome of recombinant Pichia pastoris. J Proteome Res, 2009; 8:1380–92.
(34) Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast Pichia pastoris. Mol Cell Biol, 1985; 5:1111–21.
(35) Fogel S, Welch JW. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982; 79:5342–6.
(36) Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl Microbiol Biotechnol, 2000; 54:741–50.
(37) Gellisson G, Janowicz ZA, Weydemann U, Melber K, Strasser AWM, Hollenberg CP. High-level expression of foreign genes in Hansenula polymorpha. Biotech Adv, 1992; 10:179–89.
(38) Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. BBA-Gen Subjects, 1999; 1426:227–37.
(39) Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotechnol, 2004; 22:1409–14.
(40) Gritz L, Davies J. Plasmid-encoded hygromycin-b resistance the sequence of hygromycinb phosphotransferase gene and its expression in Escherichia-coli and Saccharomycescerevisiae. Gene, 1983; 25:179–88.
(41) Grobben NG, Eggink G, Cuperus FP, Huizing HJ. Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction. Appl Microbiol Biotechnol, 1993; 39(4-5):494-498.
(42) Ha SH, Park JJ, Kim JW, Jeong JW, Noh KS, Jeon YJ, Kin HS, Kim HB. Molecular cloning and high-level expression of G2 protein of hantaan (HTN) virus 76–118 strain in the yeast Pichia pastoris KM71. Virus Genes, 2001; 22:167–73.
(43) Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, et al. Production of complex human glycoproteins in yeast. Science, 2003; 301:1244–6.
(44) Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, JiangYW, Rios S, et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. Science, 2006; 313:1441–3.
(45) Hang YD, Luh BS, Woodams EE. Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwi fruit peel. J Food Sci, 1987; 52(1):226-227.
(46) Hartwig DD, Oliveira LT, Seixas KF, Forster MK, Rizzi C, Hartleben PC, McBride JAA, Odir DA. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Microbial Cell Factories, 2010,9:98. doi: 10.1186/1475-2859-9-98.
(47) Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. Science, 2001; 291:2364–9.
(48) Herrgard MJ, Swainston N, Dobson P, et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. Nat Biotechnol, 2008; 26:1155–60.
(49) Heydari A, Moosazadeh Moghaddam M, Aghamollaei H, Yakhchali M, Bambaee B, Latifi A, Heiat M. Cloning and Expression of the Bacillus Pumilus F3 Lipase Gene into Bacillus Subtilis and Determining of Comparative Expression Level Between Native and Recombinant Enzyme. New Cell Mol Biotechnol, 2013; 3: 67-73.
(50) Higgins DR, Cregg JM. (Eds.). (1998). Pichia protocols (Vol. 103). Springer.
(51) Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant Pichia pastoris. Biotechnol Bioeng, 2004; 85:367–75.
(52) Horstkotte B, Arnau C, Francisco V, Elsholz O, Cerda V. Monitoring of sorbitol in Pichia pastoris cultivation applying sequential injection analysis. Biochem Eng J, 2008; 42:77–83.
(53) Huang CJ, Damasceno LM, Anderson KA, Zhang S, Old LJ, Batt CA. A proteomic analysis of the Pichia pastoris secretome in methanol-induced cultures. Appl Microbiol Biotechnol, 2011; 90:235–47.
(54) Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2010; 86:403–17.
(55) Inan M, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP, Dickerson K, Brown S, et al. Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (Ancylostomacaninum) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by Pichia pastoris. Enzyme Microb Technol, 1999; 24:438–45.
(56) Invitrogen. Multi-copy Pichia Expression Kit, Version E. 1999,Carlsbad, CA.
(57) Jahic M, Rotticci-Mulder J, Martinelle M, Hult K, Enfors SO. Modeling of growth and energy metabolism of Pichia pastoris producing a fusion protein. Bioprocess Biosyst Eng, 2002; 24(6):385-393.
(58) Jimenez A, Davies J. Expression of a transposable antibiotic-resistance element in Saccharomyces. Nature, 1980; 287:869–71.
(59) Johnston M. A Model Fungal Gene Regulatory Mechanism: the GAL Genes of Saccharomyces Cerevisiae. Microbiol Rev, 1987; 51:458-76.
(60) Johnson MA, Waterham HR, Ksheminska GP, Fayura LR, Cereghino JL, Stasyk OV, et al. Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast Pichia pastoris. Genetics, 1999; 151:1379–91.
(61) Jones EW, Fink GR. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast, in The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor) 1982; 181-289.
(62) Jungo C, Marison IW, von Stockar U. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of Pichia pastoris cultures: a quantitative study based in concentration gradients in transient continuous cultures. J Biotechnol, 2007;128:824–37.
(63) Khalesi R, Nazarian S, Ehsaei Z, Mansouri M, Amani J, Moazzeni M, Salimian J. Cloning and Expression of Enterotoxigenic Escherichia Coli Heat Labile Toxin B Subunit (LTB) as Vaccine Candidate. Kosar Medical Journal (KMJ), 2009; 14(2):95-100.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

(64) Kida Y, Morimoto F, Sakaguchi M. Signal anchor sequence provides motive force for polypeptide chain translocation through the endoplasmic reticulum membrane. J Biol Chem, 2009; 284:2861–6.
(65) Kjærulff S, JensenMR. Comparison of different signal peptides for secretion of heterologous proteins in fission yeast. Biochem Biophys Res Commun, 2005; 336:974–82.
(66) Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast Pichia pastoris with minimal protease production and activation. J Biosci Bioeng, 2000; 89:55–61.
(67) Kottmeier K, Mueller C, Huber R, Buechs J. Increased product formation induced by a directed secondary substrate limitation in a batch Hansenula polymorpha culture. Appl Microbiol Biotechnol, 2010; 86:93-101.
(68) Koutz PJ, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg JM, Thill G. Structural Comparison of the Pichia pastoris Alcohol Oxidase Genes. Yeast, 1989; 5:167-77.
(69) Larkin A, Imperiali B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. Biochemistry, 2011; 50:4411–26.
(70) Li B, Cao Y, Zhou1 L, Liang C, Sun F. A novel protein expression system-Pichia Pink™- and a protocol for fast and efficient recombinant protein expression. Afr J Biotechnol, 2011; 83:19464-72.
(71) Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüne N, Renugopalakrishnan V. Expression of Recombinant Proteins in Pichia Pastoris. Appl Biochem Biotechnol, 2007; 142:105–124.
(72) Li ZJ, Zhao Q, Liang H, Jiang S, Chen T, Grella D, et al. Control of recombinant human endostatin production in fed-batch cultures of Pichia pastoris using the methanol feeding rate. Biotechnol lett, 2002; 24(19):1631-5.
(73) Lin-Cereghino J, Wong WW, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biotechniques, 2005;38(1):44.
(74) Liu ZM, Zhao HL, Xue C, Deng BB, Zhang W, Xiong XH, Yao XQ. Secretory expression and characterization of a recombinant-deleted variant of human hepatocyte growth factor in Pichia pastoris. World J Gastroenterol, 2005; 11(45):7097.
(75) Macauly-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast, 2005; 22:249–70.
(76) Mansur M, Cabello C, Hernandez L, Pais J, Varas L, Valdes J, Terrero Y, Hidalgo A, Plana L, Besada V, Garcia L, Lamazares E, Castellanos L, Martonez E. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast Pichia pastoris. Biotechnol Lett, 2005; 27:339–45.
(77) Marx H, Mecklenbrauker A, Gasser B, Sauer M, Mattanovich D. Directed gene copy number amplification in Pichia pastoris by vector integration into the ribosomal DNA locus. FEMS Yeast Res, 2009; 9:1260–70.
(78) Morrow KJ Jr. Improving protein production processes. Gen Eng News, 2007; 27(5):50–41.
(79) Mousavi ML, Amani J, Tavalai M, Kamali M. Cloning , expression and purification of the gene coding translocating domain of Botulinum Neurotoxin type A. Modares Journal of Medical Sciences (MJMS), 2004; 7(2):81-92.
(80) Nevalainen KMH, Te'o VSJ, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends Biotech, 2005; 23:468–74.
(81) Ng DT, Brown JD, Walter P. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol, 1996; 134:269–78.
(82) Nunberg JH, Meade JH, Cole G, Lawyer FC, MacCabe P, Schweickart V, et al. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of Aspergillus niger. Molec Cell Biol, 1984; 2:2306–15.
(83) Orman MA, Çalık P, Özdamar TH. The influence of carbon sources on recombinanthuman- growth-hormone production by Pichia pastoris is dependent on phenotype: a comparison of MutS and Mut+. Biotechnol Appl Bioc, 2009; 52:245–55.
(84) Parekh R. Polypeptide glycosylation and biotechnology. Biotech Eur, 1989; 6(1):18–21.
(85) Papini M, Salazar M, Nielsen J. Systems biology of industrial microorganisms. In: Wittmann C, Krull WR, editors. Biosystems engineering I: creating superior biocatalysts, 120. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2010; 51–99.
(86) Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. Curr Opin Cell Biol, 2001; 13:349–55.
(87) Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics: success rates, market trends and values to 2010. Nat Biotechnol, 2004; 22:1513–9.
(88) Pfeifer TA, Hegedus DD, Grigliatti TA, Theilmann DA. Baculovirus immediate-early promotermediatedexpressionof the Zeocin(TM) resistance gene for use as a dominant selectable marker in Dipteran and Lepidopteran insect cell lines. Gene, 1997; 188:183–90.
(89) Plantz BA, Sinha J, Villarete L, Nickerson KW, Schlegel VL. Pichia pastoris fermentation optimization: Energy state and testing a growth-associated model. Appl Microbiol Biotechnol, 2006; 72:297–305.
(90) Raemaekers RJ, de Muro L, Gatehouse JA, Fordham-Skelton AP. Functional phytohemagglutinin (PHA) and Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in Pichia pastoris correct Nterminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. Eur J Biochem, 1999; 265:394–403.
(91) Riedl M. Hereditary angioedema therapy: Kallikrein inhibition and bradykinin receptor antagonism. World Allergy Organ J, 2010; 3(9):S34-S38.
(92) Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. Natural human interferon-γ: complete amino acid sequencing and determination of site of glycosylation. J Biol Chem, 1984; 259:6790–7.
(93) Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast, 1992; 8:423–88.
(94) Romanos MA, Scorer CA, Sreekrishna K, Clare JJ. The generation of multicopy recombinant strains. Methods Mol Biol, 1998; 103:55-72.
(95) Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, Glick BS. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in Pichia pastoris. Yeast, 1998; 14:783–90.
(96) Sevastsyanovich Y, Alfasi S, Cole J. Recombinant protein production: a comparative view on host physiology. New Biotechnol, 2009; *25*(4):175-180.
(97) Shen S, Sulter G, Jeffries TW, Cregg JM. A strong nitrogen source regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast Pichia pastoris. Gene, 1998; 216:93-102.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

(98) Sibirny AA, Ubiyvovk VM, Gonchar MV, Titorenko VI, Voronovsky AY, Kapultsevich YG, et al. Reaction of direct formaldehyde oxidation to CO2 are not essential for energy supply of yeast methylotropic growth. Arch Microbiol, 1990; 154:566–75.
(99) Sinha J, Plantz BA, Inan M, Meagher MM. Causes of proteolytic degredation of secreted recombinant proteins produced in methylotropic yeast Pichia pastoris: case study with recombinant ovine interferon-τ. Biotechnol Bioeng, 2004; 89:102–12
(100) Sohn SB, Graf AB, Kim TY, et al. Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast Pichia pastoris and its use for in silico analysis of heterologous protein production. Biotechnol J, 2010; 5:707–15.
(101) Soyaslan EŞ, Çalık P. Enhanced recombinant human erythropoietin production by Pichia pastoris inmethanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization. Biochem Eng J, 2011; 55:59–65.
(102) Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Gene, 1997; 190(1):55-62.
(103) Sreekrishana K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, et al. High level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biochemistry, 1989; 28:4117–25.
(104) Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M. High cell density fermentation. In: Higgins DR, Cregg JM, editors. Methods in molecular biology: Pichia protocols. Totowa NJ: Humana press; 1998.
(105) Suga M, Hatakeyama T. High efficiency transformation of Schizosaccharomyces pombe pretreated with thiol compounds by electroporation. Yeast, 2001; 18:1015-21.
(106) Sunga AJ, Cregg JM. The Pichia pastoris formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of Pichia pastoris. Gene, 2004; 330:39–47.
(107) Surribas A, Resina D, Ferrer P, Valero F. Rivoflavinmay interfere with on-linemonitoring of secreted green fluorescence protein fusion proteins in Pichia pastoris. Microb Cell Fact, 2007; 18:6-15.
(108) Swanton E, Bulleid NJ. Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. Mol Membr Biol, 2003; 20:99–104.
(109) Thorpe ED, d'Anjou MC, Daugulis AJ. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed batch fermentation of recombinant Pichia pastoris. Biotechnol Lett, 1999; 21:669–72.
(110) Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in Pichia pastoris. Nucleic Acids Res, 1987; 15:3859–76.
(111) Valipoor E, Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J, Farhadi N. Immunogenic potentials of binding domain and its C-terminus part of Clostridium botulinum Type E Neurotoxin in comparison with its toxoid. Iranian J Biotech, 2011; 9(3):181-7.
(112) Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Protein Exp Purif, 2001; 21:71-80.
(113) Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris using the GAP promoter. J Biotechnol, 2001; 88:21-35
(114) Vervecken W, Kaigorodov V, Callewaert N, Geysens S, De Vusser K, Contreras R. In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in Pichia pastoris. Appl Environ Microbiol, 2004; 70:2639–46.
(115) Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, Yao SY, Xu YG, et al. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris and a simple procedure for purifying the expression product. Biotech Bioeng, 2001; 73:74–9.
(116) Wang Z, Wang Y, Zhang D, Li J, Hua Z, Guocheng D, et al. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in Pichia pastoris fermentations. Biosource Technol, 2010; 101:1318–23.
(117) Wang Y, Yuan S, Wang P, Liu X, Zhan D, Zhang Z. Expression, purification, and characterization of recombinant human keratinocyte growth factor-2 in Pichia pastoris. J Biotechnol, 2007; 132(1):44.
(118) Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the Pichia pastoris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. Gene, 1997; 186:37–44.
(119) Werten MWT, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, De Wolf FA. High-yield secretion of recombinant gelatins by Pichia pastoris. Yeast, 1999; 15:1087–96.
(120) Wu D, Ma D, Hao YY, Chu J, Wang YH, Zhuang YP, Zhang SL. Incomplete formation of intramolecular disulfide bond triggers degradation and aggregation of human consensus interferon-alpha mutant by Pichia pastoris. Appl Microbiol Biotechnol, 2010; 85:1759–67.
(121) Wu JM, Lin JC, Chieng LL, Lee CK, Hsu TA. Combined used of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in Pichia pastoris. Enzyme Microb Tech, 2003; 33:453–9.
(122) Xie J, Zhang L, Ye Q, Zhou Q, Xin L, Du P, Gan R. Angiostatin production in cultivation of recombinant Pichia pastoris fed with mixed carbon sources. Biotechnol Lett, 2003; 25(2):173-7.
(123) Xie J, Zhou Q, Du P, Gan R, Ye Q. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant Pichia pastoris for angiostatin production. Enzyme Microb Tech, 2005; 36:210–6.
(124) Yamaguchi K, Akai K, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S. Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production. J Biol Chem, 1991; 266:20434–9.
(125) Zani ML, Nobar SM, Lacour SA, Lemoine S, Boudier C, Bieth JG, Moreau T. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and preelafin (trappin2) expressed in Pichia pastoris. Eur J Biochem, 2004; 271(12):2370-2378.
(126) Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, Pan YW, Tan YH, Fu CY, Tu FZ. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of Pichia pastoris. Mol Biol Rep, 2009; 36(6):1611-1619.
(127) Zhang AL, Zhang TY, Luo JX, chen SC, Guan WJ, Fu CY, Peng SQ, Li HL. Constitutive expression of human angiostatin in Pichia pastoris. J Ind Microbiol Biotechnol, 2007; 34:117–22.
(128) Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA. Modeling Pichia pastoris growth on methanol and optimizing the

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]

production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botolinum neurotoxin, serotype A. Biotechnol Bioeng, 2000; 70:1–8.
(129) Zhang WH, Potter KJ, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM. Pichia pastoris fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003; 30:210–5.
(130) Zhu T, Guo M, Tang Z, Zhang M, Zhuang Y, Chu J, Zhang S. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast Pichia pastoris. J Appl Microbiol, 2009; 107:954–63.
(131) Zuraw B, Yasothan U, Kirkpatrick P. Ecallantide. Nat Rev Drug Discov, 2010; 9(3):189-190.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.1.6]