

Introduzione

Lieviti per la produzione di proteine eterologhe.

Il lievito è un microrganismo unicellulare appartenente al regno dei Funghi. Finora sono state identificate 349 specie di lieviti classificate in 39 generi appartenenti alle classi *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Fungi imperfecti*. Gli ascomiceti (lieviti) più studiati e impiegati industrialmente appartengono al genere *Saccharomyces* (nella produzione di bevande alcoliche, lievito da pane, autolisati ed estratti, alcuni enzimi) e al genere *Candida* (utilizzato come fonte di proteine).

I lieviti sono molto diffusi in natura e facilmente isolabili in laboratorio per la loro capacità di dare colonie caratteristiche su terreni colturali che possono essere resi selettivi mediante aggiunte di antibiotici ai quali essi resistono. In linea generale, i lieviti preferiscono terreni colturali ricchi in zuccheri e hanno spesso esigenze per alcune vitamine e aminoacidi. Per quanto riguarda il fabbisogno di ossigeno, il loro comportamento varia da specie a specie: i saccaromiceti, ad esempio, sono tutti anaerobi facoltativi. La temperatura ottimale di crescita è tra i 20 e i 30°C e il pH ottimale intorno a 4,5-5,5.

La forma delle cellule di lievito può essere sferica, ovoidale, cilindrica o triangolare. Anche le dimensioni sono molto variabili e vanno da pochi μ a 20-30 μ di lunghezza. Tutte le cellule sono fornite di una parete, formata da strati con composizione chimica diversa.

Oggetto di studio e organismo modello è *Saccharomyces cerevisiae*, il cui genoma è stato sequenziato per intero (Goffeau et al., 1996). *S. cerevisiae* è considerato un lievito fermentativo, in quanto, anche in presenza di ossigeno, la quasi

totalità del glucosio nel terreno viene consumata attraverso la fermentazione (effetto Crabtree o repressione da glucosio) e la respirazione è indotta solo a livelli molto bassi dello zucchero (De Deken, 1966; Gancedo e Serrano, 1989).

Il ciclo vitale di *S. cerevisiae* è rappresentato in figura 1.

FIG. 1 A *Ciclo vitale del lievito.*

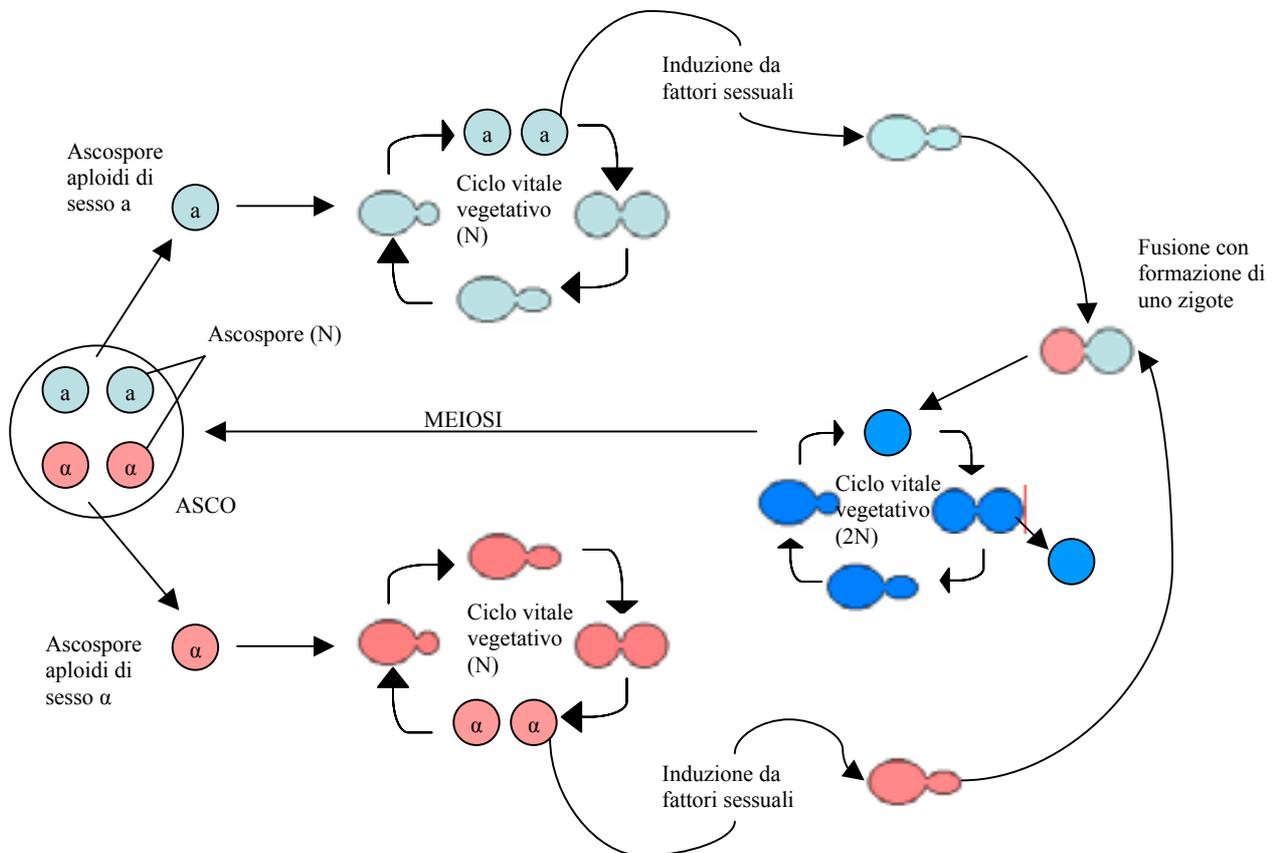


FIG. 1 B *Fotografia colorata al microscopio elettronico a scansione di cellule di S. cerevisiae, molte delle quali hanno gemme.*



Questo organismo è un eucariote aploide con due tipi sessuali \mathbf{a} ed $\mathbf{\alpha}$. I due “sessi” sono morfologicamente indistinguibili, ma gli incroci possono avvenire solo tra individui di opposto tipo sessuale. Le cellule vegetative aploidi o diploidi di questo lievito si riproducono mitoticamente e la nuova cellula deriva dalla cellula madre per gemmazione. Le cellule diploidi $\mathbf{a/\alpha}$ possono sporificare, cioè andare incontro a meiosi. I quattro prodotti meiotici sono cellule aploidi, le ascospore, contenute in un asco approssimativamente sferico. Due ascospore sono di tipo sessuale \mathbf{a} e due di tipo $\mathbf{\alpha}$. Quando l’asco è maturo, le ascospore vengono rilasciate e germinano producendo cellule vegetative aploidi. Su terreno solido, ogni ascospora dà luogo ad una colonia visibile. Attraverso la trasposizione, ovvero lo spostamento di segmenti di DNA da una localizzazione del genoma ad un’altra, in alcuni lieviti si può verificare il cambiamento del tipo sessuale della singola cellula nell’ambito di una popolazione omogenea.

In campo biotecnologico ed alimentare vengono richieste grandi quantità di proteine, alcune delle quali sono difficilmente reperibili in natura.

Grazie alla tecnologia del DNA ricombinante è stato possibile introdurre del DNA eterologo in alcuni organismi, appositamente selezionati, per ottenere la sintesi

di composti che, in condizioni normali, non fanno parte dei prodotti finali dei loro processi biosintetici. A seconda della natura delle esigenze economiche, della funzionalità del prodotto e dell'espressione del gene corrispondente, si può sfruttare un'ampia gamma di ospiti, tra i quali i batteri, i funghi, i lieviti, gli insetti, le piante o gli animali.

Tra le diverse opzioni di scelta, il lievito rappresenta sicuramente una delle più favorevoli per l'ottenimento dello scopo. Infatti, questo microrganismo è una specie eucariotica monocellulare, facile da manipolare e rapida nella crescita, capace di attuare la maggior parte delle modificazioni post-traduzionali necessarie per la produzione di proteine di mammiferi biologicamente attive.

I sistemi per la produzione di proteine eterologhe da lieviti sono quindi in rapido sviluppo ed alcune di essi hanno ottenuto anche apprezzabili livelli dal punto di vista commerciale. Ma, essendo le rese delle proteine eterologhe secrete piuttosto basse, gli studi sono stati rivolti ai metodi da impiegare per ottenerne delle quantità maggiori. Una delle strategie usate e di larga applicazione è l'uso della fusione con peptidi leader da proteine eterologhe e/od omologhe.

Il microrganismo più utilizzato è *Saccharomyces cerevisiae*, perché tra i più caratterizzati ma, nonostante ciò, presenta comunque alcuni svantaggi. Infatti, la resa del prodotto è solo dell' 1-5% rispetto al totale e le proteine secrete, inoltre, subiscono spesso una iperglicosilazione, causa di eventuali diminuzioni dell'attività biologica. Questi i motivi principali per cui l'attenzione è stata rivolta allo studio di specie alternative che possano meglio soddisfare tali esigenze. Tra queste spiccano i lieviti del genere *Kluyveromyces*, in particolare *K. lactis* sta assumendo un ruolo sempre più rilevante in settori quali la produzione di proteine eterologhe o la produzione di metaboliti.

Questo lievito è stato già impiegato su scala industriale di rennina (componente attiva del caglio; van der Berg et al. 1990). Altre potenziali applicazioni sono la produzione di β -galattosidasi ovina (Rocha et al. 1996), di albumina serica umana (Fleer et al. 1991a), di interleuchina 1 β umana (Fleer et al. 1991b), di glucoamilasi fungina (Bui et al. 1997) e di xilanasi termostabile batterica (Walsh e Berquist, 1997). Inoltre, è un microrganismo riconosciuto come GRAS (Generally Recognized As Safe, Bohekamp e Oasterom, 1994).

Le cellule di *K. lactis* sono di forma sferica od ovoidale e di dimensioni leggermente inferiori rispetto a quelle di *S. cerevisiae*. Come per gli altri lieviti, il suo ciclo vitale prevede una fase aploide e una diploide. Di solito si riproduce in forma asessuata per gemmazione, ma è possibile anche la riproduzione sessuata. La fase diploide è transitoria per la maggior parte dei ceppi (Herman e Halvorson, 1963 a), infatti, i diploidi tendono spontaneamente, o in condizioni di carenza nutritiva, ad entrare in meiosi e sporulare.

Il lievito *K. lactis* può crescere su terreno contenente lattosio come unica fonte di carbonio; infatti, la maggior parte dei ceppi è stata isolata da derivati del latte. Ciò permette di utilizzare un prodotto di scarto dell'industria casearia, il siero, come brodo di fermentazione del lievito. L'utilizzo di questa fonte di carbonio è reso possibile dalla presenza della lattosio-permeasi, un enzima specifico per il trasporto del lattosio all'interno della cellula, e dall'enzima β -galattosidasi, un enzima che ha due funzioni: catalizzare la scissione del lattosio in glucosio e galattosio e catalizzare l'isomerizzazione del lattosio ad allolattosio.

Il lievito *K. lactis* ha un apparato secretore versatile ed efficiente, che facilita la secrezione delle proteine diretta da vari peptidi segnali. Prove della migliore produttività di *K. lactis* si hanno, ad esempio, nel caso della prochimosina (van der

Berg et al. 1990) che rende 20 volte di più rispetto a *S. cerevisiae*, con un'efficienza di secrezione del 95% nel primo contro il 10% del secondo.

Il progetto per il sequenziamento completo del genoma di *K. lactis* è in fase di ultimazione. Finora la grandezza del genoma nucleare aploide è stata stimata intorno a 12 Mb, divisi in sei cromosomi di grandezze diverse. La prima mappa genetica è stata pubblicata nel 1995 (Wesolowski-Louvel et Fukuhara) e descriveva 75 loci. In seguito, il genoma è stato completato con altri 150 geni cromosomali e 588 sequenze RST (Random Sequence Tag) che identificano 292 nuovi geni, il 5% circa del totale stimato (Ozier-Kalogeropoulos et al. 1998). Un progetto recente di sequenziamento parziale e casuale ha identificato ben 2700 ORFs, la maggior parte delle quali mostra un'elevata omologia con quelle di *S. cerevisiae* (Bolotin-Fukuhara et al. 2000). La comparazione tra le ORFs presenti nei due lieviti ha dimostrato che in *K. lactis* c'è un numero elevato di geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi, mentre la ridondanza genica è inferiore rispetto a *S. cerevisiae*.

Il DNA mitocondriale di *K. lactis* consiste in una molecola circolare (Sender et al. 1974) di 39 Kb presente in 30 copie per cellula aploide. Anche se una mappa completa ancora non è stata ultimata, si può affermare la presenza di geni per gli r-RNA 15S e 21S, 22 loci t-RNA e ORFs che codificano per l'apocitocroma B, per le subunità della citocromo ossidasi e dell'ATPasi mitocondriale. Di solito la perdita di DNA mitocondriale è letale per *K. lactis*, mentre conferisce un fenotipo mutante a *S. cerevisiae* caratterizzato dall'incapacità di respirare (mutanti *petite*).

I geni eterologhi possono essere introdotti in *K. lactis* attraverso vettori specializzati per la produzione di proteine eterologhe. Un vettore è costituito da un plasmide contenente i) un marcatore di selezione, ovvero un gene che conferisca un fenotipo all'organismo ospite in modo tale da renderlo riconoscibile, ii) una cassetta di espressione formata da un promotore della trascrizione, una sequenza segnale per

la secrezione fusa con il gene della proteina richiesta e un terminatore della trascrizione, iii) un sistema di mantenimento e replicazione del vettore. A seconda del tipo di replicazione, si possono distinguere due tipi di vettori plasmidici : vettori integrativi e vettori replicativi.

I vettori integrativi mancano di un'origine di replicazione, quindi per essere trasmessi alla progenie dell'ospite devono integrarsi nel genoma del microrganismo e dipendere per la propagazione dalle funzioni associate ai cromosomi. Le loro caratteristiche sono un'elevata stabilità mitotica, ma basso dosaggio genico, che ne limita l'efficienza.

I vettori replicativi possono replicarsi autonomamente, sono presenti in un elevato numero di copie per cellula ospite ma, al contrario di quelli integrativi, sono meno stabili. Nonostante ciò, l'elevata frequenza di trasformazione li rende più pratici da utilizzare.

Nella produzione di proteine eterologhe basata su plasmidi replicativi, il controllo di un vettore per la stabilità e per il numero di copie è essenziale per determinare la quantità totale del prodotto sintetizzato. Da questo punto di vista, rappresenta sicuramente un vantaggio per la costruzione di vettori l'uso del plasmide circolare naturale pKD1, isolato in *K. lactis* var. *drosophilorum*.

Plasmidi nei lieviti.

I plasmidi sono molecole di DNA a doppia elica di dimensioni variabili da due a parecchie centinaia di migliaia di coppie di basi (bp) e non portano informazioni essenziali per la vita della cellula. Sono generalmente circolari, ma ne esistono anche con struttura lineare. Nei procarioti vi sono dei plasmidi che presentano funzioni specifiche, infatti assumono il ruolo di cromosomi accessori che portano, ad esempio, geni per la resistenza ad antibiotici o per la produzione di tossine.

Nel lievito, i plasmidi lineari finora identificati si trovano nel citoplasma delle cellule, codificano per una loro (DNA) Polimerasi e hanno una loro origine di replicazione che gli permette di replicarsi autonomamente più volte durante il ciclo cellulare. Questi plasmidi conferiscono il fenotipo killer dovuto alla secrezione di una tossina plasmidica che inibisce la crescita dei ceppi di lievito sensibili ad essa.

In *K. lactis* sono stati caratterizzati due plasmidi lineari, K1 e K2, rispettivamente di 8,9 e 134,4 Kb. Essi sono presenti in un numero di 50-100 copie per cellula e sono responsabili del fenotipo killer sopra citato (Stark et al., 1986; Gunge et al., 1986). Pur essendo plasmidi extranucleari, possiedono sequenze di replicazione autonoma nel nucleo (ARS) e sequenze terminali ripetute invertite (ITRs), che legano covalentemente all'estremità 5' due proteine di 28 e 36 KDalton (KDa). Queste proteine rivestono un ruolo fondamentale nella replicazione poiché suppliscono alla mancanza di un primer per l'attacco della DNA polimerasi (Volkert et al., 1989). K1 possiede quattro fasi di lettura aperta (ORF), che codificano sia per la tossina killer che per la resistenza ad essa. K2, invece, ha 10 ORFs, otto delle quali non sono ancora state ben identificate, però si è appurato che esse siano coinvolte nel mantenimento e nella stabilità di entrambi i plasmidi. Infatti, sono stati isolati ceppi

killer contenenti solo K1, ma mai con solo K2 (Sor e Fukuhara 1985; Wesolowsky et al., 1982). La tossina killer agisce sui ceppi sensibili durante la fase G1 del ciclo vitale, inibendo l'adenilato ciclasi e bloccando la divisione cellulare.

Finora sono stati identificati nove plasmidi circolari di lievito: 2μ in *S. cerevisiae*, pSB1 e pSB2 in *Zygosaccharomyces bailii* (Toh-e et al., 1984), pSB3 e pSB4 in *Z. bisporus* (Toh-e et al., 1984), pSR1 in *Z. rouxii* (Toh-e et al., 1982), pSM1 in *Z. fermentati* (Utatsu et al. 1987), pKD1 in *K. lactis* var. *drosophilum* (Volkert et al., 1989; Futcher 1988) e pKW1 in *K. waltii* (Chen et al., 1992).

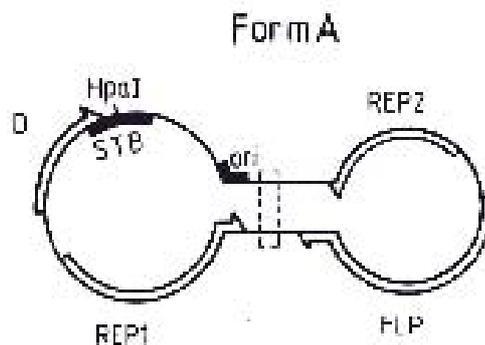
I plasmidi circolari di lievito hanno una localizzazione nucleare, vengono assemblati nella cromatina con gli istoni presenti nel nucleo e non conferiscono alcun vantaggio selettivo né fenotipo alla cellula ospite. Questi plasmidi circolari hanno una loro origine di replicazione e si replicano una sola volta durante il ciclo cellulare sfruttando il corredo enzimatico dell'ospite. Sono molecole di DNA a doppio filamento lunghe da 4 a 6 kbp e sono presenti in numero di 50-100 copie per cellula. La struttura dei plasmidi finora conosciuti è pressoché simile: presentano due sequenze ripetute invertite di dimensioni piuttosto ampie (IR). Le IR separano due regioni uniche, circa della stessa misura, che comprendono tre o quattro maggiori open reading frames (ORF). Le funzioni dei geni sono analoghe nei diversi plasmidi, che mostrano una spiccata specie-specificità per ciò che riguarda la replicazione. In tutti i plasmidi identificati, un gene codifica per una ricombinasi sito-specifica mentre altri due geni, insieme ad un locus per la stabilità cis-agente, sono coinvolti nella segregazione (o ripartizione) del plasmide alla divisione cellulare.

Le due IR e la ricombinasi sito-specifica fanno sì che il plasmide esista sottoforma di due isomeri equimolari e funzionalmente equivalenti (Volkert et al., 1989).

A parte queste similitudini strutturali e funzionali, i plasmidi circolari di lievito presentano una scarsa omologia di sequenze nucleotidiche. Solo il 30% delle sequenze che formano le ricombinasi possono essere paragonate, ma, nonostante ciò, nessuna di esse può agire nel sito bersaglio diverso da quello del plasmide di appartenenza.

Il plasmide studiato in modo più approfondito e utilizzato anche come modello per spiegare la ripartizione, la ricombinazione e l'amplificazione del numero di copie il 2μ di *Saccharomyces cerevisiae* (Volkert et al., 1989). Questo plasmide è formato da 6318 bp di DNA circolare a doppio filamento, composte di due regioni uniche separate da una coppia di sequenze ripetute invertite.

FIG. 2 *Organizzazione strutturale del plasmide circolare 2μ .*



Il 2μ non conferisce un fenotipo particolare al suo ospite. Possiede una sola origine di replicazione e 4 geni, tutti impegnati nella regolazione delle funzioni plasmidiche: uno dei geni codifica per la ricombinasi sito-specifica (FLP), due (REP1 e REP2) sono impegnati nel sistema di ripartizione e il gene rimanente (gene D) ha funzioni regolative. Altri elementi importanti sono le sequenze bersaglio della ricombinasi, poste all'interno delle IR e il locus STB cis-agente per la stabilità (Volkert et al., 1989; Futcher 1988; Murray 1987)

Il plasmide pKD1.

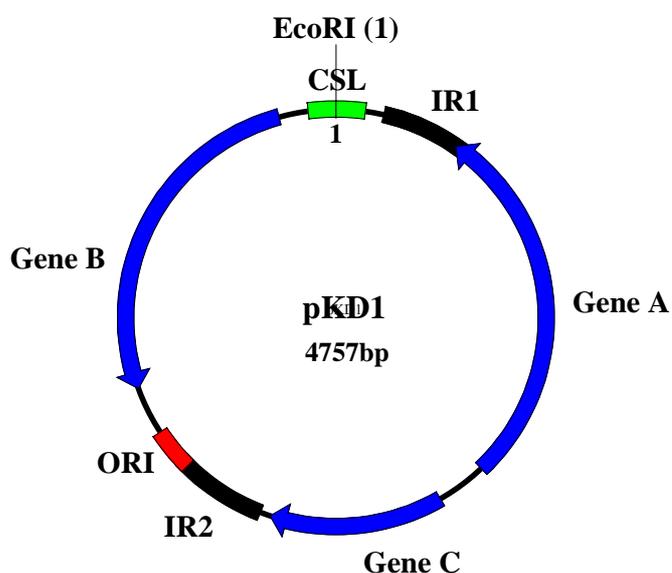
Il plasmide pKD1 è una molecola circolare di DNA originariamente isolato in *Kluyveromyces drosophilarum* e successivamente trasferito in *Kluyveromyces lactis*, dove può replicarsi in modo autonomo e mantenersi stabilmente in un alto numero di copie.

La sua sequenza nucleotidica è stata totalmente determinata (Chen et al., 1986; Falcone et al., 1986). Come gli altri plasmidi circolari di lievito, anch'esso conserva delle omologie strutturali e funzionali con il 2 μ . Questo plasmide presenta un'origine di replicazione, due geni B e C e un locus cis-agente CSL coinvolti nella ripartizione (Bianchi et al., 1991, 1992), un gene A codificante per la ricombinasi sito-specifica e le sequenze bersaglio per la ricombinasi poste all'interno delle IRs. L'origine di replicazione è stata localizzata all'interno di una regione da 375 bp posta a valle del gene B (Bianchi et al., 1987).

La ricombinazione sito-specifica in pKD1 richiede , oltre alla ricombinasi, anche i prodotti dei geni B e C; al contrario di quanto accade in 2 μ , dove la sola proteina FLP basta a garantire la sito-specificità della ricombinazione (Bianchi M.M. 1992).

A seguito dell'evento ricombinativo all'interno delle IRs, pKD1 subisce una isomerizzazione nelle due forme A e B.

FIG. 3 *pKD1* rappresentato nella forma isomerica B.



I geni B e C, analoghi a REP1 e REP2 di 2μ , se deleti, provocano un forte aumento dell'instabilità plasmidica che può essere ristabilita per complementazione in *trans*. La sequenza CSL, invece, agisce in *cis* e presenta una struttura molto diversa dal locus STB di 2μ e degli altri plasmidi circolari. Anche in questo caso, la sua delezione rende il plasmide altamente instabile, ma non è possibile la complementazione in *trans* (Bianchi et al., 1991).

Il numero di copie del plasmide *pKD1* nel ceppo selvatico è nell'ambito di 60-80 per cellula (Falcone et al., 1986) ma è ridotto a circa 20 copie per cellula nei vettori basati su *pKD1* che portano geni eterologhi. Un'ulteriore diminuzione del numero di copie si osserva quando il gene per la ricombinasi nei vettori ricombinanti è inattivato (Bianchi 1992). Al contrario, l'induzione dell'espressione di una copia integrata cromosomicamente del gene della ricombinasi aumenta il numero di copie del plasmide in tutti i casi esaminati (Morlino et al., 1999).

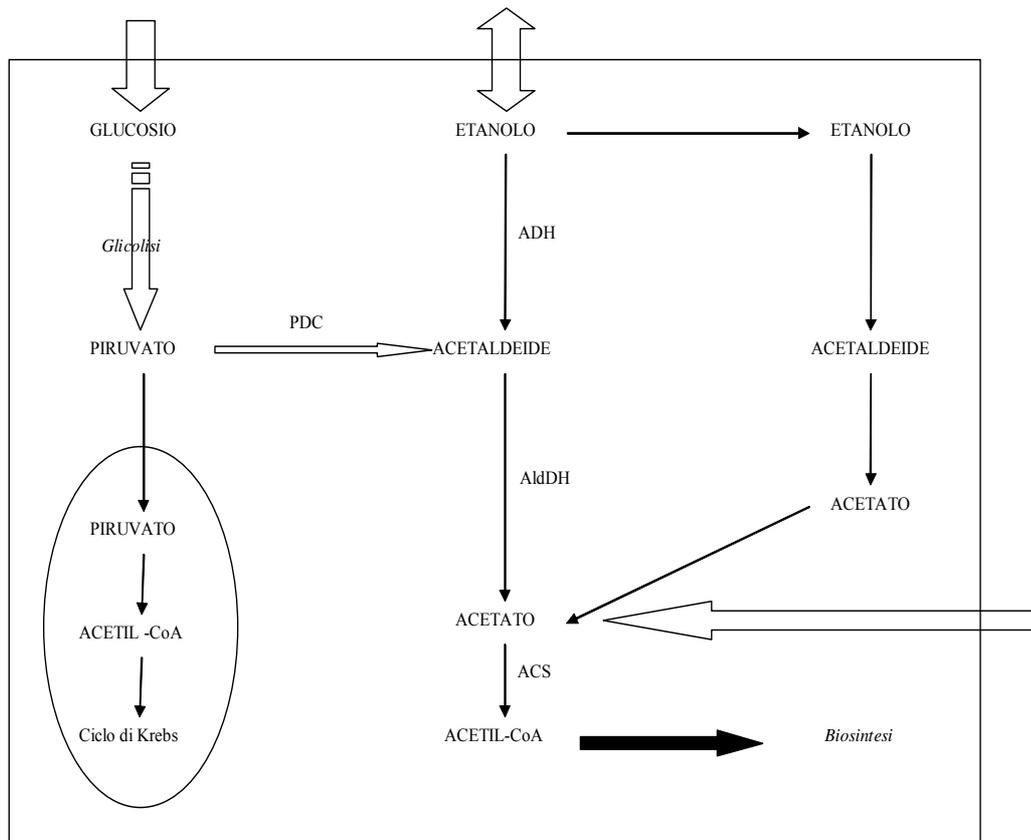
Questi dati dimostrano che il numero di copie di pKD1 è regolato positivamente dall'attività della ricombinasi plasmidica.

Inoltre, un'induzione dell'amplificazione del numero di copie di un vettore basato su pKD1 contenente una copia del gene eterologo è seguita da un corrispondente aumento nella produzione della proteina eterologa. Si è studiato in proposito l'aumento della produzione e della secrezione di due proteine eterologhe, la glucoamilasi dal lievito *Arxula adenivorans* e l'interleuchina-1 β da mammifero, seguendo l'amplificazione del dosaggio genico quando i geni delle proteine eterologhe in questione vengono inseriti in vettori basati su pKD1 (Morlino et al., 1999).

Il gene della PDC nel lievito Kluyveromyces lactis.

La maggior parte delle specie di lievito è anaerobia facoltativa e quindi metabolizza il glucosio soprattutto attraverso la respirazione. Tuttavia, grazie alla fermentazione, è possibile anche la crescita in condizioni aerobiche.

Il piruvato rappresenta il punto di diramazione tra respirazione e fermentazione; può essere decarbossilato ad acetaldeide dalla Piruvato Decarbossilasi (PDC) nel primo passaggio della via metabolica che porta alla formazione dell'etanolo oppure decarbossilato ad Acetil-CoA dal complesso della Piruvato Deidrogenasi (PDH) ed entrare poi nei mitocondri per partecipare al ciclo di Krebs. FIG. 4.



In *K. lactis*, il gene strutturale codificante per l'attività della PDC, *KIPDC1*, è stato selezionato durante la ricerca dei promotori fortemente inducibili su glucosio usando dei vettori sonda specifici. La sua identità è stata confermata per complementazione della mutazione *rag6*, allelica rispetto a *KIPDC1*, con una libreria genomica di *K. lactis* (Bianchi et al. 1996).

La proteina Klpdc1p, prodotta dal gene *KIPDC1*, presenta un'alta omologia di sequenza con le proteine strutturali PDC di lievito finora identificate, in special modo per quelle dei generi *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. La PDC è un enzima tetramero avente come coenzima la tiammina pirofosfato e attivo in presenza di ioni magnesio. I residui aminoacidici importanti per l'attività enzimatica, come quelli coinvolti nelle interazioni con la tiammina e il pirofosfato e quelli dei siti catalitici, sono conservati. L'omologia di sequenza è abbastanza elevata anche con Piruvato Decarbossilasi appartenenti a specie distanti, come le piante o il batterio *Zymomonas mobilis*.

I mutanti *rag6* e i ceppi deleti per *KIPDC1* (*Klpdc1Δ*) non possono fermentare. In generale, il fenotipo Rag- (Resistance to Antimycin on high Glucose) definisce l'incapacità di crescere su glucosio in presenza di droghe mitocondriali, mentre il fenotipo Rag+ definisce la crescita anche in tali condizioni.

I ceppi *Klpdc1Δ* non hanno trascritti che ibridano con le sonde per *KIPDC1*, non mostrano attività Piruvato decarbossilasica e non rilasciano etanolo nel terreno di crescita (Bianchi et al. 1996). Questi risultati hanno chiaramente dimostrato che *KIPDC1* è l'unico gene presente in *K. lactis* che codifica per la PDC, al contrario di quanto accade in *S. cerevisiae* dove la ridondanza di geni glicolitici è più frequente; infatti, in questo lievito esistono due geni strutturali attivi per l'enzima (PDC1 e PDC5: Kellermann et al., 1986, Schaaf et al. 1989, Seboth et al. 1990).