



acib

Austrian Centre of Industrial Biotechnology

Programm: COMET – Competence Centers for Excellent Technologies

Programmlinie: K2-Zentren

COMET-Einzelprojekt, Laufzeit und Projekttyp:

Engineering of protein secretion in *Pichia*, 01/2015 – 12/2019, multi-firm

Ein Weg hinaus? – acib Forscher bringen Licht in das Mysterium der Sekretion von Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris*

Für die biotechnologische Produktion von Chemikalien und Proteinen kommen Zellfabriken wie die Hefe *Pichia pastoris* zum Einsatz. Für die Steigerung der Produktivität ist es von großer Bedeutung, mehr über den Sekretionsprozess in dieser Hefe zu erfahren. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Fehlleitung der Proteine in die Vakuole einen Engpass bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in Hefen darstellen kann. Die genetische Deaktivierung des dabei involvierten CORVET-Komplexes, in Verbindung mit Deaktivierung von vakuolären Proteasen, verhindert diese Fehlleitung und steigert damit die Ausbeute an rekombinantem Protein signifikant.



Hefen als Zellfabrik

Hefezellen sind wichtige Werkzeuge für die „grüne“ Produktion verschiedener Chemikalien und Proteine. Biopharmazeutika und industriell benötigte Enzyme sind wichtige Beispiele dafür. In vielen Fällen bevorzugt die biotechnologische Industrie die sekretorische Produktion der Verbindungen aufgrund von geringeren Kosten für deren Aufreinigung und einer unkomplizierteren Weiterverarbeitung. Allerdings ist der Weg durch die zelluläre Sekretionsmaschinerie bis zur Außenseite der Zelle lang und birgt zahlreiche Hindernisse. So suchen Forscher auf der ganzen Welt nach Wegen, um diese Hürden zu überwinden – so auch acib-Forscher.

Die wichtigsten Hefe-Spezies, die als Zellfabriken genutzt werden, sind *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* oder *Hansenula polymorpha*. *Pichia pastoris*, als knospende Hefe, entwickelte sich dabei aufgrund der relativ kleinen Zahl an natürlich sekretierten Proteinen zu einem bevorzugten Organismus für die sekre-

torische Produktion. So ist das Zielprotein im Kulturmedium relativ rein verfügbar, und die nachstehende Reinigung wird maßgeblich erleichtert.

So weit so gut – denn es gibt einen Haken: Je nach Produkt können der Sekretion einige Hürden gegenüberstehen, die oft im selben Szenario enden: Niedrige Ausbeuten und möglicherweise sogar der Abbau des Zielproteins. Um diese Probleme zu überwinden, beschäftigen sich Forscher seit einigen Jahren mit der grundlegenden Aufklärung der Sekretionsmechanismen von *Pichia pastoris*.



Wie funktioniert der Sekretions-Apparat in *Pichia*?

Üblicherweise beginnt die Sekretion schon mit der korrekten Proteinfaltung am endoplasmatischen Retikulum (ER). Jedes Protein trägt ein Signal für seinen endgültigen Bestimmungsort – Proteine, die für die Sekretion erkannt werden, werden am Golgi-Apparat in Vesikel verpackt und

zur Zellmembran transportiert. Schließlich verschmelzen die Vesikel mit der Membran und die Proteine werden in das Medium freigegeben.

Erst vor kurzem haben Forscher rund um Brigitte Gasser und Diethard Mattanovich von acib und der BOKU Wien herausgefunden, dass die endgültige Freisetzung eines gut sekretierten Proteins (Humanes Serum-Albumin) an der Knospe erfolgt.

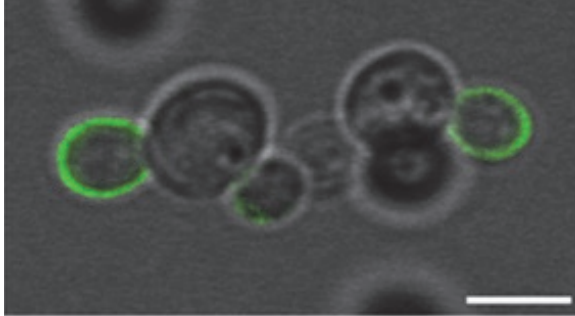


Fig. 1: Freisetzung von sekretierten Proteinen (grün) an der Zelloberfläche der Hefe. Balken: 4 µm

Weitere Experimente haben dasselbe für andere Proteine wie das nativ sekretierte Protein Epx1 sowie ein schwierig zu sekretierendes Zielprotein gezeigt. Dennoch wurde noch immer Produkt in den Zellen gefunden, hauptsächlich im ER, aber auch in der Vakuole, der Organelle in der Zelle, die hauptsächlich für Abbauvorgänge verantwortlich ist.

Wie lässt sich die Sekretionsmaschinerie in Hefen überlisten?

Trotz korrekter Faltung von sekretierten Proteinen wurde eine Fehlleitung von rekombinanten Proteinen zur Vakuole festgestellt. Einer der für den vakuolären Transport verantwortlichen Proteinkomplexe ist der sogenannte CORVET-Komplex, der aus sechs „vacuole sorting“ (VPS)–Proteinen besteht. Frühere Studien in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt,

dass eine Funktionsstörung des CORVET-Komplexes zur erhöhten Sekretion führte. Neuere Erkenntnisse vom acib und BOKU Wien konzentrierten sich auf *Pichia pastoris*, wo Mutationen in CORVET-Genen aufgrund von erhöhter proteolytischer Aktivität im Medium anfänglich nicht zu einer erhöhten Menge an sekretiertem Zielprotein geführt haben. Dies wurde durch die Fehlsekretion von vakuolären Proteasen als Folge der Unterbrechung des CORVET-Wegs verursacht. In einem neuen Experiment wurden daraufhin Stämme generiert, die Mutationen in den CORVET-Genen und die genetische Inaktivierung von bestimmten vakuolären Proteasen vereinten. Dies verbesserte die Sekretionsleistung signifikant.

Der Sekretionsweg in *Pichia pastoris* stellt sich als sehr komplex dar und es erfordert weitere Experimente, um die Zusammenhänge noch genauer zu ergründen. Allerdings sind die jüngsten Erkenntnisse ein weiterer Schritt zur Identifizierung und Überwindung der Hindernisse in der Sekretion von Proteinen.

Wirkung und Effekte

Die kontinuierliche Verbesserung von Hefen als Zellfabrik qualifiziert diese nicht nur zur Herstellung von niedrigpreisigen Produkten wie Alkohol, sondern bringt sie auch in eine exzellente Startposition für die Produktion von komplexeren Produkten wie Biopharmazeutika und technischen Enzymen, die u.a. in Waschmitteln, der Textilindustrie und der Papierindustrie genutzt werden. Von allen werden hohe Mengen benötigt und sollen kostengünstig hergestellt werden. In diesem Zusammenhang ist das Verständnis des Metabolismus und den zellulären Mechanismen der Proteinsekretion entscheidend für die Entwicklung effizienter und ökonomischer Expressionssysteme und deren Einsatz in industriellen Produktionsprozessen.

Kontakt und Informationen

K2-Zentrum acib

acib GmbH
Muthgasse 18, 1190 Vienna
T +43 1 47654 79033
E brigitte.gasser@acib.at, www.acib.at

Projektkoordination

Dr. Brigitte Gasser

Projektpartner

Organisation	Land
Biomin Research Center	Österreich
Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG	Österreich
Lonza AG	Schweiz
VTU Technology	Österreich
Sandoz GmbH	Österreich

Weitere Informationen zu COMET – Competence Centers for Excellent Technologies: www.ffg.at/comet

Diese Success Story wurde von der Konsortialführung/der Zentrumsleitung zur Verfügung gestellt und zur Veröffentlichung auf der FFG-Website freigegeben. Für die Richtigkeit, Vollständigkeit und Aktualität der Inhalte übernimmt die FFG keine Haftung.