



UPPSALA
UNIVERSITET

18-X2

Framtidens expressionssystem för svåruttryckta proteiner

Utvärdering av tolv expressionssystem

Pontus Andersson, Selma Edenståhl, Elin Eriksson, Tora
Hävermark, Jonas Nielsen, Alma Pihlblad

Beställare: Thermo Fisher

Beställarrepresentant: Daniel Larsson

Handledare: Karin Stensjö

1MB332, Självständigt arbete i molekylär bioteknik, 15 hp, vt 2018

Civilingenjörsprogrammet i molekylär bioteknik

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Abstract

Today, recombinant expression of proteins is used for a variety of purposes. One of these is the production of allergens, which are vital components in allergy diagnostics. However, traditional expression systems such as *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* might not have the capacity to express all proteins of interest. Thermo Fisher, which is a leading producer of allergy tests, has requested an evaluation of different microorganisms and their capacity for heterologous protein expression in order to expand their existing toolbox of expression systems. This summary was made through a literature study, where twelve organisms were evaluated. Six eukaryotic and six prokaryotic expression systems are compared based on their ability to properly glycosylate protein, need for specific culture conditions, safety, protease activity, duration, protein yield and protein solubility. The prokaryotic systems – *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha* and *Streptomyces lividans* – are characterized by being easy to cultivate, operating in different temperature ranges and providing relatively high yields of recombinant protein. The eukaryotic systems – *Aspergillus* fungi, the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, the yeast *Hansenula polymorpha*, the parasite *Leishmania tarentolae*, the moss *Physcomitrella patens* and suspension-based plant cells – all have very different morphology and properties. In comparison with the prokaryotic systems, it can be concluded that they are generally better at folding and providing the correct glycosylation patterns for mammalian and plant proteins. However, they require more time and effort to establish a competent cell line. Furthermore, the resulting protein yield is usually less than for the prokaryotic systems. The conclusion can be drawn that no expression system is perfect. The solution is a toolbox, containing various expression systems and vector systems, providing the basis for successful expression of all kinds of complex proteins. Based on the evaluation of expression systems in this review, such toolbox can be obtained.

1. Inledning	5
1.1 Hur rapporten ska läsas	5
2. Bakgrund	6
2.1 Rekombinant proteinframställning – steg för steg	6
2.2 Att tänka på vid val av expressionssystem	8
3. Metod	10
4. Resultat	11
4.1 Utvärdering av expressionssystem – en sammanfattning	11
4.2 Prokaryota expressionssystem	14
4.2.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> – den grampositiva jordbakterien	14
4.2.1.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	14
4.2.1.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem	15
4.2.1.3 Utsöndring och rening	16
4.2.1.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	16
4.2.2 <i>Lactococcus lactis</i> – den grampositiva bakterien som är ett bra alternativ för uttryck av växtbaserade proteiner	17
4.2.2.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	18
4.2.2.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem	18
4.2.2.3 Utbyte och renhetsgrad	19
4.2.2.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	20
4.2.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> – en snabbväxande bakterie med mångsidig metabolism	21
4.2.3.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	22
4.2.3.2 Optimeringsmetoder	22
4.2.3.3 Utbyte och renhetsgrad	23
4.2.3.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	24
4.2.4 <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> – den kalla bakterien	24
4.2.4.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	25
4.2.4.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem	25
4.2.4.3 Utsöndring	26
4.2.4.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	26
4.2.5 <i>Ralstonia eutropha</i> – den gramnegativa bakterien med stor möjlighet till produktion av korrekt veckade proteiner	27
4.2.5.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	28
4.2.5.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem	28
4.2.5.3 Utbyte	29
4.2.5.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	29
4.2.6 <i>Streptomyces lividans</i> – den stabilt enzymutsöndrande jordbakterien	30
4.2.6.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	31
4.2.6.2 Optimeringsmetoder	32
4.2.6.3 Utbyte och renhetsgrad	33

4.2.6.4 Exempel på uttryckta proteiner	34
4.3 Eukaryota expressionssystem	36
4.3.1 <i>Aspergillus</i> – svampsläktet som briljerar inom enzymindustrin	36
4.3.1.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	36
4.3.1.2 Optimering – det största problemet är en ineffektiv utsöndring av heterologa proteiner	37
4.3.1.3 Vektorsystem – promotorer och selektionsmarkörer	38
4.3.1.4 Exempel på uttryckta proteiner och utbyte	39
4.3.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> – den snabbväxande grönalgen	39
4.3.2.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	40
4.3.2.2 Hur går transformation i kloroplasten till?	41
4.3.2.3 Optimering – för att öka utbytet	41
4.3.2.4 Exempel på uttryckta proteiner	42
4.3.3 <i>Hansenula polymorpha</i> – den termotoleranta jästen som är ett bra val för uttryck av instabila och känsliga proteiner	43
4.3.3.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	44
4.3.3.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem	44
4.3.3.3 Utbyte och renhetsgrad	45
4.3.3.4 Exempel på uttryckta proteiner och kommersiell tillgänglighet	46
4.3.4 <i>Leishmania tarentolae</i> – en parasit i människans tjänst	47
4.3.4.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	48
4.3.4.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem	48
4.3.4.3 Utbyte och renhetsgrad	50
4.3.4.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	50
4.3.5 <i>Physcomitrella patens</i> – mossan som är ett lovande alternativ till proteinproduktion i däggdjursceller	52
4.3.5.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	52
4.3.5.2 Optimeringsmetoder	53
4.3.5.3 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner	54
4.3.6 Suspensionsbaserad växtcellsodling – växtcellerna som kan odlas i fermentorer utan solljus	54
4.3.6.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov	55
4.3.6.2 Optimering – framtiden kräver högre utbyten	56
4.3.6.3 Vektorsystem	56
4.3.6.4 Exempel på uttryckta proteiner och utbyte	57
4.3.6.5 Kommersiell tillgänglighet och kostnad	58
5. Diskussion	59
5.1 Prokaryoter vs. eukaryoter	59
5.2 De prokaryota systemen	60
5.3 Eukaryota expressionssystem – bra på veckning men arbetar långsamt	62
5.4 Eukaryoter med prokaryota egenskaper?	63
5.5 Slutsats – inget system är perfekt	64

6. Etisk analys	65
6.1 Proteinframställning och dess utveckling	65
6.2 Traditionella metoder för proteinframställning väcker miljöetiska frågor	66
6.2.1 Rekombinant proteinframställning kan minska matsvinnet – ett konsekvensetiskt perspektiv	66
6.2.2 Mikroorganismers och djurs egenvärde – ett pliktetiskt perspektiv	66
6.3 Rekombinant proteinframställning i däggdjursceller – en fråga om egenvärden	67
6.4 Riktlinjer kring säkerhet vid användningen av patogena värdceller är livsviktig	68
6.5 Förändra organismers genom – etiskt fel enligt vissa	69
6.5.1 Särskilda fall – livsåskådningar	69
6.5.2 Andra farhågor kring genomförändringar	69
6.6 Sammanfattande jämförelse mellan framställning rekombinant och via extrakt	70
7. Tack till	70
8. Referenser	71
Bilaga 1: Expressionssystem som inte nådde hela vägen	81
1.1 Prokaryota expressionssystem som inte togs med	81
1.2 Eukaryota expressionssystem som inte togs med	82
Bilaga 2: Ordlista	83
Bilaga 3: Referenser till tabell 1	90
Bilaga 4: Referenser till tabell 2	92

1. Inledning

Proteiner är en grupp av makromolekyler med en oerhörd bredd av biokemiska funktioner. Det har gjort dem viktiga inom områden såsom läkemedels- och livsmedelsproduktion. Dessa stora möjligheter har drivit utvecklingen för att kunna isolera och producera enskilda proteiner för kommersiellt bruk. I dag finns två tillvägagångssätt för proteinframställning – det ena är att extrahera och rena fram målproteinerna ur den naturliga källan och det andra är genom rekombinant proteinproduktion. Att uttrycka proteiner rekombinant ger många gånger större produktmängder än utvinning ur den naturliga källan och är således att föredra. Ett av de mest etablerade expressionssystemen för rekombinant proteinuttryck är bakterien *Escherichia coli* (Ferrer-Miralles *et al.* 2015).

Thermo Fisher är ett multinationellt företag som bland annat tillverkar verktyg för allergidiagnostik. I detta arbete krävs framställning av allergena proteiner och idag utvinns en del av dem ur den naturliga källan medan andra uttrycks rekombinant i värdcellerna *Escherichia coli* och *Pichia pastoris*. Dessa system fungerar vanligtvis bra för små proteiner med en enkel struktur, men vid framställning av mer komplexa proteiner kan de vara otillräckliga. Det beror exempelvis på att de inte har samma maskinerier för posttranslationella modifieringar som högre eukaryoter. Det kan således bli svårt att uttrycka exempelvis växtproteiner i bakterieceller.

För att kunna utöka sin katalog av heterologt uttryckta proteiner är Thermo Fisher i behov av expressionssystem alternativa till *E. coli* och *P. pastoris*. I den här rapporten beskrivs och utvärderas tolv expressionssystem som kan underlätta produktionen av svåruttryckta proteiner.

Projekt mål

Att hitta och utvärdera expressionssystem relevanta för Thermo Fishers produktion av allergena proteiner utöver de som används idag.

- Relevanta expressionssystem som ska utvärderas är prokaryota system utöver *E. coli* och eukaryota system utöver *P. pastoris*, däggdjursceller och insektsceller. Totalt ska *minst* 10 system presenteras.

1.1 Hur rapporten ska läsas

Den här rapporten utvärderar 12 olika expressionssystem. Dess egenskaper och de största för- respektive nackdelarna är sammanfattade i två tabeller under avsnitt 4.1. Utifrån tabellerna kan läsaren själv bestämma vilket expressionssystem som är intressant att läsa vidare om. Rapporten behöver alltså inte läsas i sin helhet för att förstå varje system i sig. Om rapporten läses i PDF-format är namnen på organismerna i tabellerna länkade till den detaljerade utvärderingen. Även rubrikerna i innehållsförteckningen är länkade. I

diskussionen följer en jämförelse mellan de olika expressionssystemen där de ställs mot varandra.

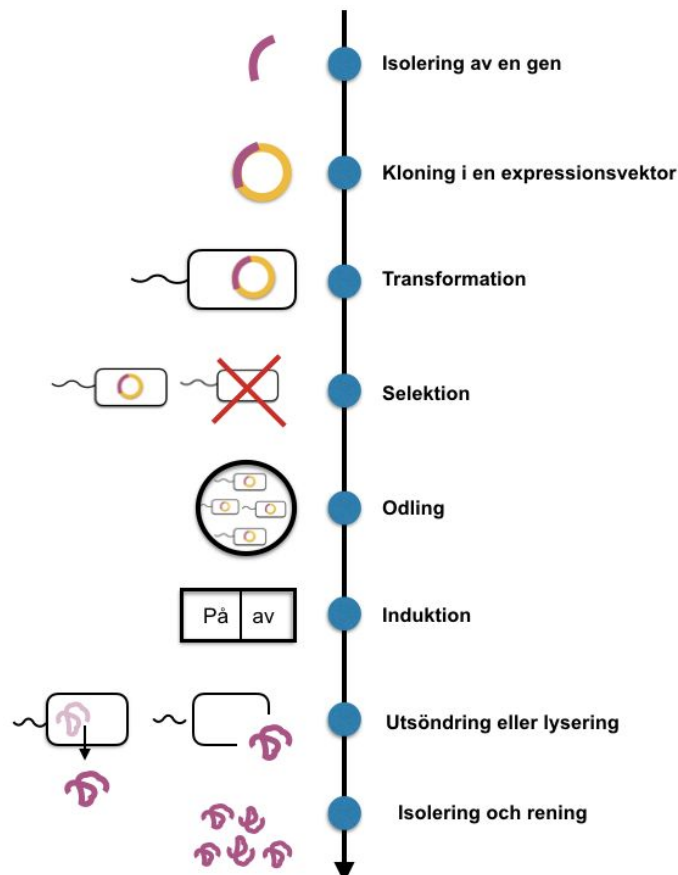
Ord markerade med en asterisk (*) i texten är ord som finns förklarade mer ingående i en ordlista. Denna hittas i bilaga 2.

2. Bakgrund

I denna rapport definieras ett expressionssystem som en värdorganism som rekombinant framställer proteiner i produktionssyfte. Den gen som kodar för det protein som önskas uttryckas förs in i ett expressionssystem och uttrycks sedan i detta. Genen överförs till expressionssystemet via ett vektorsystem som till exempel kan vara en plasmid eller ett virus.

2.1 Rekombinant proteinframställning – steg för steg

Produktionprocessen för rekombinant proteinframställning varierar, i figur 1 presenteras ett allmänt arbetsflöde.



Figur 1: Övergripande steg i produktionen av rekombinanta proteiner. Se texten nedan för förklaring av respektive steg.

Isolering av gen av intresse

Den eller de gener som är intressanta isoleras och amplifieras, till exempel med polymeraskedjereaktion (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) (Cox & Nelson 2008).

Kloning i expressionsvektor

Generna klonas in i en expressionsvektor, vanligtvis en plasmid. Den nu rekombinanta plasmiden amplifieras oftast i *E. coli* (Cox & Nelson 2008). Det finns två typer av promotorer som kan användas i vektorsystem; inducerbara eller konstitutiva. Hos en inducerbar promotor kan genuttrycket regleras på/av (Johns *et al.* 2016) och hos en konstitutiv promotor är uttrycket kontinuerligt (Liang *et al.* 1999).

Transformation

Transformation används som ett generellt begrepp för det tekniska steg då själva överföringen av plasmiden till expressionssystemet sker. Överföringen i bakterier kan till exempel ske genom att en plasmid tas upp genom naturlig transformation, eller genom att en virulent plasmid används för infektion av cellen (Cox & Nelson 2008). I både prokaryoter och eukaryoter är en vanlig transformationsmetod dessutom elektroporering.

Selektion av transformerade kloner

Vektorsystemen innehåller även en selektionsmarkör, till exempel antibiotikaresistens, som gör att endast de transformerade cellerna överlever vid tillsats av antibiotika (Cox & Nelson 2008).

Odling

De selekterade cellerna får växa under kontrollerade odlingsförhållanden med avseende på bland annat pH, tryck, temperatur, kolkällor och näringsämnen (Liu *et al.* 2015). Olika värdceller når sitt tillväxtmaximum vid olika tidpunkter, och det är vanligtvis då cellerna skördas (Maiké *et al.* 2014).

Induktion

Om vektorsystemet som används innehåller promotorer som är inducerbara, det vill säga kan reglera när proteinet ska uttryckas, krävs att kulturen induceras efter att den uppnått optimal odlingsdensitet. Induktionen innebär att en molekyl (eller annat som till exempel ljus och temperatur) som aktiverar promotorn (inducerare) tillsätts vilket aktiverar genuttrycket. På så sätt fås produktion av det rekombinanta proteinet vid den tidpunkt som önskas (Maiké *et al.* 2014).

Om vektorsystemet som används innehåller promotorer som är konstitutiva utesluts detta steg.

Utsöndring eller lysering

Efter att proteinerna uttryckts i sitt expressionssystem måste de frigöras från sin värdcell. Detta görs antingen med utsöndring (proteinerna utsöndras utan att värdcellen skadas) eller med lysering (celler förstörs och proteinerna frigörs).

Vid utsöndring transporteras det rekombinanta proteinet till önskad plats, ofta ut till membranet. Detta görs genom att genen för en signalpeptid, en molekyl inblandad i proteinets transport, i en organism förs in i expressionssystemet. Denna placeras intill genen för proteinet som ska uttryckas. På så sätt möjliggörs utsöndring av målproteinet. Då gramnegativa bakterier har två cellmembran, går det inte alltid att utsöndra alla proteiner. I grampositiva är detta betydligt lättare (von Heijne 1990).

Isolering och rening

För att underlätta reningen av proteiner kan olika typer av taggar adderas på målproteinet. Till exempel kan proteiner renas fram med hjälp av kromatografi via polyhistidin-tag (his-tag) (Cox & Nelson 2008).

2.2 Att tänka på vid val av expressionssystem

Idag uttrycks rekombinanta proteiner i en mängd olika expressionssystem. Där bland eukaryota system som däggdjursceller, insektsceller, växter och jäst samt prokaryota system som bakterier (Schmidt & Hoffman 2002). Varje expressionssystem har sina för- och nackdelar. Viktiga faktorer att tänka på vid val av expressionssystem kan till exempel vara:

- Posttranslationella modifieringar
- Säkerhet
- Odlingsförhållanden och utrustningsbehov
- Kostnad
- Utbyte

Som en generell regel gäller att proteinproduktionen i ett optimalt expressionssystem ska efterlikna proteinets naturliga produktion. Till exempel är det optimalt om ett eukaryot, posttranslationellt modifierat protein uttrycks i en värdcell som är eukaryot och utför de posttranslationella modifieringar som proteinet behöver för att vara biologiskt aktivt (Price & Nairn 2009).

Produktion av proteiner i ett expressionssystem som inte liknar proteinets naturliga värd, eller överuttryck av rekombinanta proteiner generellt, kan leda till bildandet av inklusionskroppar (Price & Nairn 2009). Inklusionskroppar är felveckade proteiner som klumpar ihop sig och bildar olösliga aggregat i cellen. Detta kan bland annat bero på att proteinet som uttrycks är större än de proteiner som uttrycks naturligt i värdcellen och kan exempelvis vara fallet vid uttryck av däggdjursproteiner i bakterier. Det kan även bero på att proteinsyntesen sker för snabbt i cellen (Palomares *et al.* 2004).

Organismer utför olika slags posttranslationella modifieringar

Posttranslationella modifieringar är förändringar av proteiner som uppstår efter att proteinerna translaterats i ribosomerna (*Nature*, post-translational modifications). Detta kan innebära addering av olika funktionella grupper på proteinerna såsom glykosylering, alltså tillfogning av kolhydrater på proteinet (*Nationalencyklopedin*, glykosylering).

Posttranslationella modifieringar innebär även veckningsprocesser, såsom bildandet av disulfidbryggor, som behövs för att proteinet ska få en korrekt veckning och vara funktionellt (*Nature*, post-translational modifications). Posttranslationella modifieringar är ofta avgörande för ett proteins funktion, stabilitet och antigena egenskaper (*Nationalencyklopedin*, glykosylering).

Olika värdorganismer har förmågan att utföra olika posttranslationella modifieringar av proteiner beroende på om de är prokaryota eller eukaryota, och posttranslationella modifieringar varierar även signifikant mellan olika organismer. Till exempel har däggdjursproteiner ett visst glykosyleringsmönster som inte liknar det glykosyleringsmönster som bildas på proteiner uttryckta i jäst (Dingermann 2008). Det är därför viktigt att, vid val av expressionssystem, studera det protein som ska uttryckas och vilka modifieringar detta specifika protein behöver för att vara stabilt och funktionellt.

Säkerhet

Vissa expressionssystem, framförallt bakterier, kan vara patogena vilket kan göra dem farliga att hantera. Förutom detta finns risken att värdcellerna uttrycker toxiner, såsom endotoxiner, vilket kan försvåra reningen av proteinet. Många organismer som används som expressionssystem är klassificerade som GRAS (*eng.* Generally Recognized as Safe), vilket innebär att de säkert kan användas inom läkemedels- och livsmedelsproduktion (Lubertozzi & Keasling 2009).

Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

Värdceller har olika levnadssätt och kräver olika förhållanden för att kunna odlas. Dessa inkluderar bland annat pH, tryck, temperatur, kolkällor, näringsämnen och ljus. Beroende på hur och under vilka förhållanden en värdcell behöver odlas, har också expressionssystem olika utrustningsbehov. Till exempel kräver många suspensionsbaserade växtsystem odling i fotofermentorer (Liénard & Nogué 2009), reaktorer som tillåter genomsläpp av ljus, eftersom dessa organismer behöver ljus för att kunna utvinna energi. Ett annat exempel är däggdjursceller som kräver en steril labbmiljö för att inte riskera hotas av mikrobiell kontaminering (Obom *et al.* 2014). Det finns även risk att värdceller hotas infekteras av olika slags patogener vid odling (Carrera Pacheco *et al.* 2018)

Kostnad

Det finns olika faktorer som kan komma att påverka kostnaden för framställning av rekombinanta proteiner i ett expressionssystem, dessa kan till exempel vara:

- Inköp av värdceller – såsom bakterier eller däggdjursceller
- Odlingstid – tiden det tar för en värdcell att uppnå en viss tillväxt är olika för olika organismer
- Näringskällor/media
- Utrustning – till exempel avancerade fermentorer

År 2016 angavs till exempel den övergripande kostnaden för växtbaserad proteinproduktion vara omkring 50–1000 amerikanska dollar per gram protein, medan odling av

däggdjursceller ansågs dyrast, nämligen 1000–10 000 dollar per gram protein (Santos et al. 2016).

Utbyte

Utbytet, alltså mängden protein som uttrycks, kan variera signifikant mellan olika expressionssystem. Beroende på hur mycket protein som ska uttryckas bör system väljas utifrån den mängd protein detta system har möjlighet att producera.

Varje expressionssystem kräver optimering

Inget expressionssystem är perfekt och därför krävs ofta någon form av optimering för att förbättra uttrycket av rekombinanta proteiner i ett system. Dessa inkluderar bland annat samuttryck av chaperoner och signalpeptider, kodonoptimering, undvikande av proteaser samt val av promotorer (Palomares *et al.* 2004).

Thermo Fisher vill kunna uttrycka allergener som naturligt härstammar från många olika källor, såsom växter och djur. Detta betyder att de proteiner som uttrycks kan komma att kräva helt olika slags posttranslationella modifieringar för att vara funktionella. Detta kräver en bredd och diversitet av det expressionssystem som används. I denna rapport presenteras förslag på värdorganismer som skulle kunna utgöra framtida expressionssystem för rekombinant proteinframställning hos Thermo Fisher.

3. Metod

Projektet har utförts genom en litteraturstudie som delades in i tre olika faser, samt en slutlig rapportskrivning och förberedelser inför presentationer. Den första fasen av litteraturstudien bestod av att få en inblick i ämnet och vilka expressionssystem som skulle undersökas. För detta steg delades projektgruppen in i två arbetsgrupper där den ena gruppen sökte efter prokaryota system och den andra gruppen efter eukaryota system. De sökmotorer som användes för att hitta relevanta vetenskapliga artiklar var Scopus och PubMed. För sökningen användes gemensamma nyckelord. De expressionssystem som valdes att söka vidare kring bestämdes utifrån de avgränsningar som satts för projektet, vilka var:

- Odlingen ska vara suspensionsbaserad och fungera i fermentorer à 20 liter.
- Inte utvärdera insektsceller.
- Inledningsvis inte utvärdera däggdjursceller.
- *E. coli* och *P. pastoris* ska inte utvärderas som expressionssystem.
- Systemet ska vara etablerat och kommersiellt åtkomligt för Thermo Fisher.
- Systemet ska ge minst 50 mg/l rent protein i utbyte om proteinet utsöndras, eller några mg/g pellet om proteinet är i cytosoliskt.
- Odlingen ska fungera för temperaturer över 5 °C.

Den andra fasen av litteraturstudien bestod av att fördjupa sig inom de expressionssystem som blivit valda. Alla i projektgruppen sökte information, genom vetenskapliga artiklar på

Scopus och PubMed, om olika system. Den tredje och sista fasen bestod av att sammanställa de resultat som samlats in till en flytande text där följande punkter var i åtanke vid utvärderingen:

- Förväntat utbyte
- Renhetsgrad på protein
- Kommersiell tillgänglighet
- Utrustningsbehov
- Exempel på proteiner som uttrycks i expressionssystemet
- Tidsåtgång för odling och proteinuttryck

Utöver informationssökningen där vetenskapliga artiklar lästes och utvärderades hölls ett möte med en specialist inom området rekombinant proteinframställning för att få mer inspiration och bli mer insatta i ämnet.

Under rapportskrivningen hade olika personer i projektgruppen ansvar för de olika delarna såsom inledning, metod, bakgrund, resultat och diskussion. Ansvar delades även ut gällande förberedelser för posterpresentation och slutlig presentation. Parallellt med litteraturstudien samt utformningen av rapporten och presentationerna hölls en kontinuerlig dialog med handledare och beställarrepresentant för att få återkoppling och inspiration till arbetet. För att se en mer utförlig projektmetod kan Projektplan ses i elektroniskt appendix.

4. Resultat

4.1 Utvärdering av expressionssystem – en sammanfattning

För att kunna utöka Thermo Fishers verktygslåda av expressionssystem* har tolv förslag utvärderats:

Prokaryoter – *Corynebacterium glutamicum* (grampositiv), *Lactococcus lactis* (grampositiv), *Pseudomonas fluorescens* (gramnegativ), *Pseudoalteromonas haloplanktis* (gramnegativ), *Ralstonia eutropha* (gramnegativ) och *Streptomyces lividans* (grampositiv).

Eukaryoter – svampsläktet *Aspergillus*, grönalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, jästen *Hansenula polymorpha*, parasiten *Leishmania tarentolae*, mossan *Physcomitrella patens* och suspensionsbaserad växtcellsodling.

Dessa system har alla olika för- och nackdelar och tillsammans kompletterar de varandra, men inget system är perfekt i alla avseenden. Val av expressionssystem bör styras av målproteinets natur, till exempel med avseende på posttranslationella modifieringar och toxicitet. För att förenkla valet sammanfattas här resultatet av utvärderingen från varje

system i form av två tabeller. Tabell 1 listar de största för- respektive nackdelarna för varje system och tabell 2 sammanfattar ett antal egenskaper. I avsnitt 5.2 och 5.3 presenteras varje system mer ingående.

Tabell 1: Sammanställning av de största för- respektive nackdelarna för varje expressionssystem.

Organism	Största fördelarna	Största nackdelarna
<i>C. glutamicum</i> (grampositiv bakterie)	Etablerad på marknaden med låg proteasaktivitet och inga endotoxiner ^[1]	Ganska lik <i>E. coli</i> i utbytesnivåer men behöver odlas längre ^[2] och är inte lika etablerad som <i>E. coli</i> ^[1]
<i>L. lactis</i> (grampositiv bakterie)	Låg proteasaktivitet och inga endotoxiner ^[3] , har uttryckt många allergener ^[4,5]	Oftast ganska låga utbyten, inga utbyten över 50 mg/l hittades i litteraturen ^[4-6]
<i>P. fluorescens</i> (gramnegativ bakterie)	En verktygslåda för screening är tillgänglig ^[7] och ger höga utbyten efter optimering ^{[7][8]}	Gramnegativ bakterie som tenderar att bilda inklusionskroppar ^[9]
<i>P. haloplanktis</i> (gramnegativ bakterie)	Alla proteiner som uttryckts har varit lösliga till skillnad från de andra gramnegativa systemen <i>E. coli</i> ^[10] och <i>P. fluorescens</i> ^[9]	Ännu inte särskilt etablerat system och specialutrustning kan krävas om odling önskas vid låga temperaturer ^[10]
<i>R. eutropha</i> (gramnegativ bakterie)	Kan fermenteras till höga celldensiteter utan att ansamla tillväxthämmande syror ^[11]	Plasmidförlust är vanligt förekommande ^[12]
<i>S. lividans</i> (grampositiv bakterie)	Låg proteasaktivitet ^[13] och effektiv enzymutsöndring med bibehållen funktion ^[14]	Filamentös morfologi leder till långsam tillväxt jämfört med andra bakterier ^[15] och de bildar klumpar i mediet ^[16]
<i>Aspergillus</i> (filamentös svamp)	Snabbväxande ^[17] och ger höga utbyten ^[18] jämfört med andra eukaryoter	Ineffektiv utsöndring av heterologa proteiner* och hög proteasaktivitet ^[18]
<i>C. reinhardtii</i> (mikroalg)	Kan odlas hetero- och fotoautotroft ^[19] , snabbväxande jämfört med andra hela växter ^[20]	Uttryck i kloroplaster gör att den inte kan glykosylera proteiner ^[21]
<i>H. polymorpha</i> (Jäst)	Bra för uttryck av instabila och toxiska proteiner ^[22] , snabb tillväxt ^[23]	Ibland lägre utbyten än <i>P. pastoris</i> ^[24]
<i>L. tarentolae</i> (protozoo)	Transgener kan uttryckas stabilt i flera generationer ^[25] , snabbväxande ^[26] jämfört med växter	Ger ganska låga utbyten ^[26] , endast två exempel har hittats med utbyte över 50 mg/l ^{[27][28]}
<i>P. patens</i> (mossa)	Mycket effektiv på homolog rekombination och ett av de mest använda växtsystemen ^[29]	Måste odlas i fotobioreaktorer ^[29]
Växtceller	Samma veckningsmaskineri som hela växter men är snabbare att odla, kräver inte ljus, är billigare och ger högre utbyten ^[30]	Är ännu inte lika etablerat som många prokaryota system och däggdjurssystem ^[30]

* Siffrorna hänvisar till en separat referenslista. Denna hittas i bilaga 3.

Tabell 2: Sammanställning av urval av egenskaper för varje expressionssystem. PTM är förkortning för posttranslacionella modifieringar.

	Näringskälla	Odlings-temp.	Proteas-aktivitet	Aerob / anaerob	Producerar endotoxiner	Patogen	Tid för odling**	Ungefärligt utbyte***	PTM
<i>C. glutamicum</i>	Kolhydrater, t.ex. glukos ^[1,2]	30°C ^[1,3,4,5]	Låg ^[6]	Aerob ^[1]	Nej ^[6]	Nej ^[6]	Snabb ^[1,7]	Högt ^[3,8,9,10]	Prokaryota ^[1]
<i>L. lactis</i>	Kolhydrater, t.ex. glukos eller laktos ^[11]	30°C ^[11,12]	Låg ^[13]	Aerob och anaerob ^[11]	Nej ^[13]	Nej ^[13]	Snabb ^[75]	Lågt ^[14,15]	Prokaryota ^[13]
<i>P. fluorescens</i>	Kolhydrater, t.ex. glycerol ^[16-18]	32°C ^[16-18]	Medel ^[18]	Aerob ^[18,19]	Ja ^[20]	Nej ^[18]	Snabb ^[17,18]	Högt ^[17,18]	Prokaryota ^[20]
<i>P. haloplanktis</i>	T.ex. glukos ^[25]	-2,5-15°C ^[23]	Ingen data	Aerob ^[24]	Ja ^[25]	Ingen data	Snabb ^[22,26,27]	Lågt – högt ^[23,28,29]	Prokaryota ^[25]
<i>R. eutropha</i>	Oorganiskt och organiskt kol, t.ex. fruktos och glycerol ^[30,31]	30°C ^[31,32]	Ingen data	Aerob och anaerob ^[76]	Ja ^[30]	Nej ^[77]	Snabb – medel ^[32]	Medel ^[32]	Prokaryota ^[30]
<i>S. lividans</i>	Kolhydrater, t.ex. glukos ^[33,34]	28-30°C ^[3,34]	Låg ^[35,36]	Aerob ^[37]	Ingen data	Nej ^[85]	Snabb – medel ^[33,34]	Medel – högt ^[33,34,38]	Prokaryota ^[37]
<i>Aspergillus</i>	Kolhydrater, glukos, melass etc. ^[39]	30-40°C ^[40]	Hög ^[41]	Aerob ^[40]	Nej ^[42]	Toxiner kan existera ^[43]	Snabb ^[40]	Medel – högt ^[80-84]	Eukaryota ^[43]
<i>C. reinhardtii</i>	Ljus + CO ₂ eller organisk källa t.ex. acetat ^[44,45]	20-32°C ^[46]	Medel ^[89]	Aerob ^[44]	Nej ^[44]	Nej ^[45]	Medel – långsam ^[48]	Lågt ^[49,50,51]	Eukaryota ^[48]
<i>H. polymorpha</i>	Metanol, xylos etc ^[52,53]	37-43°C ^[54]	Medel ^[88]	Aerob ^[55]	Nej ^[87]	Nej ^[78]	Snabb ^[56]	Högt ^[52,57]	Eukaryota ^[58]
<i>L. tarentolae</i>	Kolhydrater, t.ex. glukos i BHI-medium ^[59,60]	26°C ^[61-63]	Ingen data	Aerob ^[90]	Nej ^[60,62]	Nej ^[63]	Medel ^[62]	Lågt ^[62]	Eukaryota ^[59]
<i>P. patens</i>	Oorganiskt kol, CO ₂ , för fotosyntes ^[64]	20-25°C ^[65]	Ingen data	Aerob ^[66]	Nej ^[66]	Nej ^[66]	Långsam ^[66]	Lågt ^[91,92]	Eukaryota ^[66]
Växtceller	Kolhydrater, t.ex. sukros ^[67]	20-28°C ^[6,8]	Låg – medel ^[86]	Aerob ^[70]	Nej ^[67]	Nej ^[70]	Långsam ^[67,6]	Medel ^[71-74]	Eukaryota ^[67]

** Tid för odling definieras: snabb < 5 h, medel = 5-10 h, långsam > 10 h.

*** Utbytesmängd definieras: lågt < 50 mg/l, medel = 50-100 mg/l, högt > 100 mg/l.

**** Siffrorna hänvisar till en separat referenslista. Denna hittas i bilaga 4.

4.2 Prokaryota expressionssystem

En utförlig sammanställning av bakterierna *Corynebacterium glutamicum*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha* och *Streptomyces lividans* som expressionssystem följer här. I bilaga 1 listas också andra prokaryota expressionssystem som till en början tycktes intressanta, men som av olika anledningar uteslöts från vidare studier.

4.2.1 *Corynebacterium glutamicum* – den grampositiva jordbakterien

Corynebacterium glutamicum är en grampositiv jordbakterie (Maïke *et al.* 2015). Den är väletablerad på marknaden då den har använts i över 50 år, främst till aminosyraproduktion. Den är välstuderad och GRAS-klassificerad*. Två exempel på aminosyror som framställs i *C. glutamicum* idag är L-glutamat och L-lysin. Dessutom är *C. glutamicum* fabrik för organiska syror, diaminer, alkoholer (Maïke *et al.* 2015) och farmaceutiska proteiner (Sun *et al.* 2017).

Bakterien är fördelaktig att använda i fermenteringsindustrin eftersom den är icke-sporulerande, icke-patogen och inte producerar endotoxiner*. Dessutom kan den utsöndra korrekt veckade proteiner direkt till cellmediet och har låg eller ingen proteasaktivitet vilket gör den lämplig för att producera just proteaskänsliga proteiner. *C. glutamicum*'s odlingsegenskaper, genetik och biologiska processer är väl studerade vilket underlättar arbetet med bakterien (Liu *et al.* 2016).

4.2.1.1 Odlingförhållanden och utrustningsbehov

Utrustningsbehov och odlingstemperatur

Eftersom *C. glutamicum* är en bakterie som är etablerad i industrin och fungerar bra att odla i fermentor* (Date *et al.* 2006), kräver den inte någon mer avancerad utrustning än den som krävs vid rekombinant proteinframställning med *E. coli*.

Den optimala odlingstemperaturen för *C. glutamicum* är 30 °C (Date *et al.* 2006, Maïke *et al.* 2015, Siddiqi *et al.* 2017, Sun *et al.* 2017) och den odlas vid aeroba förhållanden (Maïke *et al.* 2015). Produktionen i *C. glutamicum* tycks inte svår att skala upp från liten odling till odling i fermentor (Siddiqi *et al.* 2017).

Tidsåtgång jämfört med *E. coli*

En av nackdelarna med *C. glutamicum* är att den har låg transformationseffektivitet jämfört med *E. coli* (Sun *et al.* 2017), vilket gör odlingsprocessen långsammare. Tiden för odling är vanligtvis ungefär 24 timmar (Date *et al.* 2006, Maike *et al.* 2015).

Odlingsmedium

Det finns ett flertal media som kan användas vid odling av *C. glutamicum*. Nedan listas några av dessa:

- CGXII med glukos (Maike *et al.* 2015, Hemmerich *et al.* 2016)
- 2xTY (Maike *et al.* 2015)
- Frö (*eng. seed*) (Sun *et al.* 2017)
- Hjärn- och hjärtinfusion (Date *et al.* 2006)
- Maltos och glukonat (Liu *et al.* 2016)
- MMTG (Date *et al.* 2006)

4.2.1.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem

Proteinuttrycket i *C. glutamicum* påverkas av val av värdstam, vektor och odlingsmedium, men också fermentorparametrar såsom tryck, pH och temperatur (Liu *et al.* 2016).

Vektorsystemet med T7 RNA-polymeras samt induktion

Ett exempel på ett vektorsystem* som utvecklats i *C. glutamicum* är det T7-baserade systemet* för stammen *C. glutamicum* MB001, som uttryckte gult fluorescerande protein samt pyruvatkinas (PYK). När systemet inducerades med isopropyl- β -d-1-thiogalactopyranosid (IPTG) blev uttrycket av gult fluorescerande protein upp till 450 gånger större än utan induktionen*. När samma experiment utfördes med *E. coli* och resultaten jämfördes upptäcktes att *C. glutamicum* bildade en mer homogen population.

Det nya vektorsystemet testades också med genen PYK som fick en 40 gånger aktivitetökning efter induktion jämfört med utan. Fluorescensen (aktiviteten) mättes till fyra gånger högre med T7 RNA-polymeraset än när *tac*-promotorn användes tillsammans med det endogena* RNA-polymeraset. Sammanfattningsvis kan ett högt genuttryck fås av de tidigare nämnda proteinerna genom användning av T7 RNA-polymeras-systemet som starkt regleras av IPTG (Maike *et al.* 2015).

Fler exempel på vektorer som använts i *C. glutamicum* för rekombinant proteinframställning

Det finns flera vektorsystem för proteinproduktion i *C. glutamicum*, även om det är långt ifrån det antal som finns för *E. coli*. Här följer ett urval av dessa vektorsystem (Liu *et al.* 2016).

- pWLQN med *tac*-promotor
- pPGIFN med *tac*-promotor
- pPSPTG1 med *cspB*-promotor och CspA som signalpeptid*

- pASJ103, pASJ104 med PorB-promotor och PorB som signalpeptid
- pH36M2 med H36-promotor och porB som signalpeptid

4.2.1.3 Utsöndring och rening

***C. glutamicum* kan utsöndra proteiner direkt till odlingsmediet**

Generellt sett ger *C. glutamicum* ett lägre utbyte än *E. coli*. Dock kan den grampositiva *C. glutamicum*, till skillnad från *E. coli*, utsöndra proteiner direkt ut till odlingsmediet (Sun *et al.* 2017). Detta underlättar rening och kan ge ett högre uttryck för vissa proteiner. *C. glutamicum* saknar dessutom extracellulär hydrolytisk- och proteasaktivitet, vilket underlättar reningen och minskar risken för inaktiva inklusionskroppar (Liu *et al.* 2016).

Signalpeptider för att effektivisera utsöndringen

För att optimera och effektivisera utsöndringen* samt öka utbytet kan signalpeptider från exempelvis *Bacillus subtilis* användas för att utnyttja den generella Sec-utsöndringsvägen*. Signalpeptidscreening är en effektiv metod för att avgöra vilka signalpeptider som är optimala för att utsöndra ett visst heterologt protein* med ett visst expressionssystem. Då testas ett stort antal signalpeptider och den eller de som mest effektivt transporterar ut målproteinet i mediet behålls. I en studie användes cutinase som modellprotein och även här användes IPTG för induktion. Studien visar att Sec-signalpeptider från *B. subtilis* är funktionella även i *C. glutamicum*, trots stor skillnad i bakteriernas GC-innehåll. Detta innebär att heterologa signalpeptidsbibliotek kan användas för att optimera rekombinant proteinutsöndring i *C. glutamicum* (Hemmerich *et al.* 2016).

4.2.1.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

***C. glutamicum* är välstuderad och kommersiellt tillgänglig**

Tack vare att användningsområdena av *C. glutamicum* är breda, har bakterien stor potential i rekombinant proteinframställning. Inom området finns flertalet studier med framgångsrika resultat, även om ytterligare studier behöver göras (Liu *et al.* 2016). *C. glutamicum* är någorlunda etablerad på marknaden. På grund av detta är dess genetik och optimala odlingsförhållanden välkända och flertalet vektorsystem finns tillgängliga (Sun *et al.* 2017). Det har gjorts satsningar för att studera genetiken hos *C. glutamicum* vidare för att optimera produktion (Sun *et al.* 2017).

Stammen *C. glutamicum* ATCC13869 har kommersialiserats som ett expressionssystem av ett japanskt företag. Produkten heter CORYNEX™ och används för produktion av antikroppsfragment, som effektivt kan uttryckas och utsöndras i detta system (Date *et al.* 2006, Hemmerich *et al.* 2016).

Exempel på proteiner som uttryckts i *C. glutamicum*

Flertalet proteiner har uttryckts rekombinant i bakterien varav flera är komplexa och humana. Några exempel ses i tabell 3.

Tabell 3: Exempel på proteiner som har uttryckts i *C. glutamicum* med tillhörande utbyte om data finns tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Gammainterferon från får	Ingen data	Billman-Jacobe <i>et al</i> 1994
Transglutaminas	235 mg/l	Kikuchi <i>et al.</i> 2003
Humant epidermal tillväxtfaktor (hEGF)	156 mg/l	Date <i>et al.</i> 2006
Endoxylanaser (XynA-Ba, XynA-St)	615 mg/l	An <i>et al.</i> 2013
Gult fluorescerande protein (EYFP)	Ingen data	Maike <i>et al.</i> 2015
Pyruvatkinas (PYK)	Ingen data	Maike <i>et al.</i> 2015
Antikroppsfragment (M18 scFv)	746 mg/l	Yim <i>et al.</i> 2014
Kutinas	Ingen data	Hemmerich <i>et al.</i> 2016
β -glukosidas	Ingen data	Siddiqi <i>et al.</i> 2017

4.2.2 *Lactococcus lactis* – den grampositiva bakterien som är ett bra alternativ för uttryck av växtbaserade proteiner

Lactococcus lactis är en GRAS-klassificerad*, grampositiv bakterie som har använts mycket inom matindustrin för fermentering av mejeriprodukter, men som även har etablerats inom rekombinant proteinframställning på en storskalig nivå (Song *et al.* 2017). *L. lactis* anses vara ett bra alternativ för att exempelvis uttrycka utsöndrande proteiner, membranproteiner och växtbaserade proteiner (Ferro *et al.* 2018). I och med att bakterien är grampositiv och därmed endast har ett cellmembran är det enklare att utsöndra proteiner direkt till den extracellulära miljön. Detta kan jämföras med extraktion av intracellulärt uttryckta proteiner som ofta är svårare då proteinerna lätt kan fastna i periplasman. Dessutom har bakterien inga endotoxiner och endast ett extracellulärt proteas* vilket leder till en lägre risk för att de heterologa proteinerna bryts ner (Song *et al.* 2017). *L. lactis* har en relativt enkel och välkänd metabolism och kan odlas i fermentor (Morello *et al.* 2008).

4.2.2.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

L. lactis tillåter många alternativ för odling

L. lactis är fakultativt anaerob, vilket innebär att den kan leva både anaerobt och aerobt. Den kan växa i flera olika medier, men det är viktigt att mediet kompletteras med en kolkälla (Villatoro-Hernández *et al.* 2012). M17 är ett vanligt använt medium, tillsammans med 0,5 % glukos eller laktos. Transformation* kan ske genom elektroporering*. Cellerna odlas vid 30 °C utan skakning (Villatoro-Hernández *et al.* 2012, Zhang & Ai 2016, Ferro *et al.* 2018). Tiden för odling är ungefär 24 timmar (Yagnik *et al.* 2016).

Hur påverkas uttrycket av olika odlingsförhållanden?

Det har visat sig att odlingsförhållandena starkt påverkar hur uttrycket av olika rekombinanta proteiner blir, i såväl utbyte och löslighet som i konformation. Exempelvis har en längre produktionstid visat på ökad aktivitet. Vid tre timmar efter inducering av proteinexpression var lösligheten av de uttryckta proteinerna 68 %, vilket är väldigt högt i jämförelse med exempelvis *E. coli* som bara når 10–18 % vid liknande förhållanden. Det visade sig dock att optimala förhållanden för att få så mycket lösligt protein som möjligt var missgynnande för den konformationella kvaliteten (Cano-Garrido *et al.* 2014).

4.2.2.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem

Optimal odlingstemperatur

Vad gäller optimal odlingstemperatur verkar skillnaden vara väldigt liten mellan 25 och 30 °C när det handlar om lösligt och olösligt protein. Den specifika aktiviteten var dock märkbart högre vid 30 °C än 25 °C. Vid en sänkning av temperaturen till 16 °C sjönk både uttrycket av lösligt och olösligt protein, men den specifika aktiviteten* var i princip densamma som vid 30 °C. Detta var vid uttryck av ett fluorescerande protein benäget att bilda aggregat (Cano-Garrido *et al.* 2014).

Det vanligaste vektorsystemet är NICE

Det finns tre olika system som har utvecklats för rekombinant proteinframställning i *L. lactis*. Dessa är "the nisin inducible controlled gene expression" (NICE), P170 och zinksystem (Cano-Garrido *et al.* 2014). Genom utveckling av olika vektorsystem som är designade för heterolog proteinproduktion i *L. lactis*, är det möjligt att uttrycka både prokaryota och eukaryota proteiner rekombinant i denna bakterie. Vektorsystemen kan antingen innehålla en inducerbar promotor som reglerar uttryck, eller en stark konstitutiv promotor som ständigt är aktiv (Villatoro-Hernández *et al.* 2012).

NICE är det vanligaste systemet som används för proteinframställning i *L. lactis* idag och är kommersiellt tillgängligt. Inducerbara system, såsom NICE, är att föredra i de fall då de proteiner som önskas framställas är toxiska eller interagerar med värdcellens metabolism (Ogaugwu *et al.* 2018). Exempel på använda plasmider är pMG36e, som har använts vid

uttryck av grönt fluorescerande protein (Noreen *et al.* 2011), och pNZ8148, som har använts vid uttryck av membranproteiner (Frelet-Barrand *et al.* 2010).

L. lactis har även uttryckt allergena proteiner

Vid uttryck av jordnötsallergen Ara h 2 i *L. lactis* användes plasmiden pAMJ399. Två derivat av stammen *L. lactis* MG1363 testades, nämligen CHW4 och CHW9. Den stam som producerade mest rekombinant protein var CHW9, där promotorn P170 användes (Glenting *et al.* 2007). Vid uttryck av kvalsterallergen Der p 2 användes pNZ8148 som plasmid i *L. lactis* NZ9000. Transformationen skedde via elektroporering (Zhang & Ai 2016).

Optimering för uttryck av membranproteiner

Genom användning av NICE-systemet i *L. lactis* har membranproteinet yttermembranprotein A (*eng.* outer membrane protein A, OmpA) uttryckts. NICE anses vara det mest optimala systemet för heterolog proteinframställning av membranproteiner, dock krävs det optimering av flertalet faktorer för att uttrycket ska bli effektivt. Faktorer som anses spela en mycket stor roll i optimeringen är koncentration av inducerare, effekt av värdens proteaser samt proteinutfällningsmedel (Yagnik *et al.* 2016).

Två proteaser har identifierats hos L. lactis

Den mest begränsande faktorn när det kommer till stabil produktion av rekombinanta proteiner med NICE-systemet är proteolytisk nedbrytning. Två stora proteaser har identifierats hos *L. lactis*-stammarna. Ett av dessa är intracellulärt, ClpP, och ett är extracellulärt, HtrA. Genom att inkorporera en proteas-inhiberande blandning under uttryck av proteinet OmpA kan nedbrytning av de rekombinanta proteinerna förebyggas. HtrA är ett protein som bryter ned felveckat protein på cellytan. För att bekämpa den oundvikliga nedbrytningen uttrycktes OmpA i en HtrA-defekt stam, vilket gav ett bra resultat. När det gäller proteinutfällningsmedel var metanol bättre lämpad för uttryck av OmpA än vad triklorättiksyra (TCA) var (Yagnik *et al.* 2016).

4.2.2.3 Utbyte och renhetsgrad

Uttryck och utbyte av membranproteiner och ett allergen

Utbytet av rekombinant protein visade sig vara två till tre gånger så stort vid induktion i 4 timmar vid 30 °C än vid 20 °C, vid uttryck av ett perifert och fem integrala membranproteiner. För det perifera membranproteinet blev utbytet 5–10 mg/l och för de integrala proteinerna gavs ett utbyte på omkring 30 mg/l (Frelet-Barrand *et al.* 2010).

Vid uttryck av ett av dessa proteiner, det perifera ceQORH, i *E. coli* brukar det bildas inklusionskroppar och proteinet hittas inte associerat med membranet. Detta är alltså inte fallet för *L. lactis*, där den specifika aktiviteten för proteinet dessutom var högre än i *E. coli* (Frelet-Barrand *et al.* 2010).

Vid uttryck av jordnötsallergen Ara h 2 i *L. lactis* gavs ett utbyte på 40 mg/l där det rekombinanta proteinets immunreaktivitet var jämförbar med det nativa proteinets (Glenting *et al.* 2007).

4.2.2.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

Uttryck av komplexa proteiner och alternativ lösning för förbättrade uttryck

I en studie har 31 rekombinanta proteiner framställts. Dessa proteiner är olika antigen av *Plasmodium falciparum* med en varierande storlek på 9–90 kDa, olika mängder disulfidbryggor och med olika komplexitet i struktur. Av de 31 proteinerna uttrycktes 17 stycken genom utsöndring med ett högt utbyte. I de fall där expressionen misslyckades bestod de flesta proteinerna av intramolekylära disulfidbryggor.

En lösning på problemet med de disulfidrika generna var att fusera dem till en integral proteindomän som kallas GLURP-R0 och är ett transportprotein. Med denna lösning gavs ett utbyte på 1–40 mg/l av de disulfidrika proteinerna. De proteiner som inte innehöll disulfider gav ett utbyte på 2–75 mg/l (Singh *et al.* 2018).

Ett exempel på ett tidigare svåruttryckt protein i både prokaryota och eukaryota system är Pfs48/45. Detta protein är ett disulfidrikt protein och kandidat som vaccin mot malaria som har uttryckts på ett korrekt sätt i *L. lactis* (Singh *et al.* 2018).

L. lactis – ett bra alternativ för rekombinant produktion av membranproteiner

L. lactis anses vara ett bra val för att uttrycka bland annat membranproteiner i och med att de, till skillnad från exempelvis *E. coli*, endast har ett membranlager. Vidare har bakterien ett litet genom samt låg proteolytisk aktivitet (Song *et al.* 2017). Membranproteiner är vanligtvis svåra att uttrycka i och med att de är hydrofoba och har en låg naturlig förekomst i cellerna. När dessa uttrycks rekombinant är de ofta felveckade, giftiga för värdcellen och uttrycks med ett lågt utbyte. Dock anses *L. lactis*, som tidigare nämnt, vara ett bra alternativ att använda sig av för att kunna uttrycka dessa membranproteiner på ett korrekt sätt. Flertalet eukaryota membranproteiner har uttryckts rekombinant i *L. lactis* (Frelet-Barrand *et al.* 2010).

Exempel på uttryckta proteiner

Listade exempel på uttryckta proteiner i *L. lactis* kan ses i tabell 4, med utbyte om tillgängligt.

Tabell 4: Exempel på uttryckta proteiner i *L. lactis* och utbyte där data finns tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
ceQORH	Ingen data	Frelet-Barrand <i>et al.</i> 2010
Plasmodium falciparum antigen MSP2 ^{3D7}	20 mg/l	Singh <i>et al.</i> 2018
Plasmodium falciparum antigen nMSP3 ^{3D7}	40 mg/l	Singh <i>et al.</i> 2018
Plasmodium falciparum antigen MSPDBL2	15 mg/l	Singh <i>et al.</i> 2018
Plasmodium falciparum antigen GAMA	5 mg/l	Singh <i>et al.</i> 2018
Plasmodium falciparum antigen RALP-1	10 mg/l	Singh <i>et al.</i> 2018
Ara h 2	40 mg/l	Glenting <i>et al.</i> 2007
Der p 2	Ingen data	Zhang & Ai 2016

4.2.3 *Pseudomonas fluorescens* – en snabbväxande bakterie med mångsidig metabolism

Pseudomonas fluorescens är en gramnegativ, stavformad bakterie som kan röra sig med hjälp av flertalet flageller. *P. fluorescens* orsakar vanligtvis inte sjukdomar hos människor men kan ändå ge upphov till opportunistiska infektioner, det vill säga infektioner vid nedsatt immunförsvar (*Nationalencyklopedin*, pseudomonader). *P. fluorescens* är klassad som biologisk skyddsnivå* 1, den lägsta nivån med avseende på inneslutning av potentiellt farliga organismer (Retallack *et al.* 2012).

P. fluorescens lämpar sig inom biotekniken bland annat på grund av att arten, i likhet med *E. coli*, har förmåga till storskalig produktion av rekombinanta proteiner och förmågan att växa till en hög celldensitet – över 100 g/l (Chen 2012). Flertalet signalpeptider hos *P. fluorescens* har identifierats, vilka tillåter proteinveckning i periplasman. Detta är fördelaktigt då disulfidbindningarna lättare skapas i periplasmans oxidativa miljö (Chen 2012).

4.2.3.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

P. fluorescens är obligat aerob, men inte fermentativ. Vid syrebrist minskar därför tillväxt- och proteinuttryckshastigheten utan att någon problematisk ackumulering av acetat sker. Av denna anledning är *P. fluorescens* inte lika beroende av exakt kontroll av syre- eller glukoskoncentration som exempelvis *E. coli* (Retallack *et al.* 2012, Chen 2012).

Använda stammar och transformationsmetoder

Exempel på stammar av *P. fluorescens* som använts är MB214 (Huang *et al.* 2007), DC454 och DC1189 (Jin *et al.* 2011). Transformation av plasmider in i cellen sker oftast genom elektroporering* (Jin *et al.* 2011). Selektion av transformerade celler sker genom selektion för antibiotikaresistens mot exempelvis tetracyklin (Huang *et al.* 2007).

Odlings skala och förhållanden för optimalt uttryck

P. fluorescens har odlats och uttryckt proteiner i såväl milliliterskala på skakinkubator, som i 1-liters och 75-liters fermentorer med normal syresättning. Oavsett hur stor skala odlingen skett i har mineralsaltmedium använts med temperatur på 32 °C och pH mellan 6,5 och 7,0. Glycerol är den vanligaste kolkällan och för att inducera proteinexpressionen används isopropyl- β -d-1-thiogalactopyranosid (IPTG) som inducerare (Huang *et al.* 2007, Jin *et al.* 2011, Retallack *et al.* 2012). Stammarna har odlats i mellan 24 och 48 timmar och mängden uttryckt protein har analyserats omkring 16 timmar efter tillsats av induceraren (Jin *et al.* 2011, Retallack *et al.* 2012).

4.2.3.2 Optimeringsmetoder

Val av signalpeptider är avgörande för proteinutbytet

En nödvändig metod för att i slutändan erhålla bra proteinutbyte från *P. fluorescens* är att studera olika signalpeptider som kan ta målproteinet till periplasman där korrekt och effektiv veckning kan ske. Då de exakta mekanismerna för när en viss signalpeptid är fördelaktig är okända, krävs en screening* av många sådana (Jin *et al.* 2011, Retallack *et al.* 2012, Chen 2012).

Då proteinet G-CSF skulle uttryckas rekombinant i *P. fluorescens* inleddes studien med att skapa 17 plasmider med olika signalpeptider som sedan infördes i *P. fluorescens* DC454. Efter 24 timmars parallella uttryck i milliliterskala jämfördes utbytet från dessa olika system. Det visade att valet av signalpeptid hade stor inverkan på proteinutbytet, där CupA2, LAO, Pbp och Pbp-A20 V gav högst utbyte (Jin *et al.* 2011). Då en optimal stam, med avseende på avsaknad av proteas, hittats testades 7 olika signalpeptider för denna vid småskalig fermentering. Det visade att stammen CS529-901, med DsbA som signalpeptid i plasmiden p529-016, gav det största utbytet av lösligt och korrekt veckat Met-G-CSF. Fermentering av denna stam skalades därför upp till 1-liters fermentor och resulterade i periplasmisk expression av lösligt G-CSF (Jin *et al.* 2011).

Proteasdefekta stammar och fermenteringsförhållanden optimerar proteinuttrycket

Proteaser kan i värsta fall bryta ned det protein som uttrycks i värdcellen. Det har visat sig fördelaktigt att screena mängder av proteasdefekta mutanter för att identifiera stammar med lägre nedbrytande proteasaktivitet, och följaktligen förhöjt proteinutbyte (Jin *et al.* 2011, Retallack *et al.* 2012).

Fermenteringsförhållanden påverkar det erhållna utbytet och kan variera mellan stammar av *P. fluorescens*. Olika fermenteringsförhållanden screenades vid en studie och visade sig ha stor inverkan på det resulterande proteinuttrycket (Retallack *et al.* 2012).

Återlösning av inklusionskroppar kan göras effektivt

För att göra lösligt protein av de inklusionskroppar som bildats vid uttryck av det insekticida proteinet Cry34Ab1 i *P. fluorescens* testades två olika metoder. Den mer traditionella metoden är att inklusionskropparna först isoleras och därefter löses upp och återveckas. I en annan metod extraheras och upplöses inklusionskropparna direkt från cellen. Den sistnämnda visade sig vara betydligt mer effektiv, 70 % extraktionseffektivitet jämfört med 20 % effektivitet hos den traditionella metoden (Huang *et al.* 2007).

Kombinationer av optimeringar är den optimala lösningen

En "verktygslåda" med kombinationer av stammar, plasmider och signalpeptider för rekombinant proteinuttryck i *P. fluorescens* har skapats. Med hjälp av denna och en effektiv 96-brunns-odling (parallellodling i milliliterskala) kan kombinationer av "verktyg" screenas. Genom detta ska stammar som resulterar i högt uttryck av ett önskat protein kunna identifieras inom några veckor (Retallack *et al.* 2012).

Viktigt att notera är att trots att screening av stammar i milliliterskala med 96-brunns-odling kan visa att stammar ger liknande utbyte, så kan stora skillnader i utbyte ändå förekomma på fermenteringsnivå. Av denna anledning är det nödvändigt att testa flera optimeringsvarianter även i fermentor (Retallack *et al.* 2012).

4.2.3.3 Utbyte och renhetsgrad

Vid uttryck av proteinet Met-G-CSF i *P. fluorescens* erhöles ett ungefärligt utbyte på 350 mg/l i 1-liters fermentor 16 timmar efter induceringen av proteinuttrycket. Aktivt G-CSF renades genom kromatografi till 97 % renhet (Jin *et al.* 2011).

Cry34Ab1 och Cry35Ab1, två insekticida proteiner med ursprung från *Bacillus thuringiensis*, har uttryckts i *P. fluorescens* med utbyte på 3–4 g/l och rening till över 98 %. Detta efter att inklusionskroppar bildats och återlösts. Även vid uttryck i *E. coli* bildas inklusionskroppar, det bästa utbytet efter återlösning därifrån är 100 mg/l (Huang *et al.* 2007).

Nitrilaser uttryckta av *P. fluorescens* ska ha uttryckts med produktutbyte på hela 25 g/l (Chen 2012). Andra exempel på renhetsgrad är proteinet TcdB som har uttryckts med över 90 %

renhet och Fab som renades till över 95 % renhet (Retallack *et al.* 2012).

4.2.3.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

P. fluorescens har i omkring 20 år använts till produktion av proteiner för jordbrukstillämpningar och vård (Retallack *et al.* 2012). Med hjälp av stamutveckling av *P. fluorescens* genom parallell screening har Retallack *et al.* uppvisat löslig expression av svåruttryckta proteiner i 85 % av 75 fall som i andra system misslyckats eller skett i inaktiv form. Exempel i tabell (Retallack *et al.* 2012).

Lösligt periplasmiskt Met-G-CSF uttrycktes i *P. fluorescens*, medan G-CSF uttryckt i *E. coli* leder till bildandet av inklusionskroppar som därefter måste återlösas (Jin *et al.* 2011). För fler exempel på uttryckta proteiner från *P. fluorescens*, se tabell 5.

Tabell 5: Exempel på uttryckta proteiner i *P. fluorescens* med tillhörande utbyte.

Protein	Utbyte	Referens
Granulocytolonistimulerande faktor (G-CSF)	350 mg/l	Jin <i>et al.</i> 2011
Single-chain variable fragment (scFv, antikroppsderivat)	>1 g/l	Retallack <i>et al.</i> 2012
Fragment antigen-binding (Fab, antikroppsderivat)	1–2 g/l	Retallack <i>et al.</i> 2012
Circumsporozoite Protein, malaria-vaccin (CSP)	>5 g/l	Retallack <i>et al.</i> 2012
Cowpea Chlorotic Mottle virus-like particle (VLP)	20 g/l	Retallack <i>et al.</i> 2012

4.2.4 *Pseudoalteromonas haloplanktis* – den kalla bakterien

Pseudoalteromonas haloplanktis är en gramnegativ, psykrotrof (köldtolerant) (Parrilli & Tutino 2017), aerob (Tutino *et al.* 2001) bakterie som har isolerats från antarktiskt havsvatten. Det var den första gramnegativa antarktiska bakterien att bli helgenomsekvenserad och annoterad (Rippa *et al.* 2012). *P. haloplanktis* TAC125 är den stam som främst används vid rekombinant proteinframställning och flertalet vektorsystem har satts upp, trots att bakterien inte ännu är helt etablerad på expressionsmarknaden (Parrilli & Tutino 2017).

De proteiner som framgångsrikt uttryckts rekombinant i bakterien har varit både lösliga och rätt veckade. Eftersom den är psykrotrof och därmed har en annan livsstil än de konventionella expressionssystemen har *P. haloplanktis* också ett annat veckningssystem.

Detta gör den lämplig för svåruttryckta proteiner. Uppskalning av proteinproduktion i *P. haloplanktis* är möjlig tack vare syntetiska medium och studier av optimala fermenteringsvillkor. Att bakterien har kort odlingstid för att vara psykrotrof, i kombination med att den kan uppnå en hög celldensitet, gör den attraktiv för utveckling av proteinexpression vid låga temperaturer (Parrilli & Tutino 2017).

4.2.4.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

Inklusionkroppar har aldrig upptäckts i *P. haloplanktis*

P. haloplanktis kan uttrycka proteiner i temperaturer mellan -2.5 och 15 °C, vilket ökar möjligheten att förbättra kvaliteten och lösligheten för proteinerna. Detta eftersom en sänkt temperatur destabiliserar de interaktioner som förekommer i aggregat (Sannino et al. 2017). Av denna anledning har inklusionskroppar aldrig upptäckts vid rekombinant proteinframställning i *P. haloplanktis*. En nackdel är dock att speciellt anpassade fermentorer krävs för att kunna odla i låga temperaturer. Dessutom tar odlingen längre tid än det gör med exempelvis *E. coli* (Rippa et al. 2012, Sannino et al. 2017).

Exempel på medium som används vid rekombinant proteinproduktion i *P. haloplanktis*

- LIV-medium (leucin, isoleucin och valin) (Giuliani et al. 2011)
- GG-medium (glutamat och glukonat) (Sannino et al. 2017)
- MM (eng. minimal medium) (Parrilli & Tutino. 2017).
- TYP (medium containing bacto-tryptone, yeast extract, and NaCl) (Parrilli & Tutino. 2017, Rippa et al. 2012, Parrilli et al. 2010)

Från minusgrader till ljummet under ett dygn

I de studier som gjorts har odlingstemperaturen varierat; *P. haloplanktis* kan odlas i såväl -2,5 °C (Sannino et al. 2017), 0 °C (Sannino et al. 2017), 4 °C (Cusano et al. 2006, Parrilli et al. 2010, Sannino et al. 2017) som 15 °C (Parrilli et al. 2010, Rippa et al. 2012, Sannino et al. 2017).

Hur länge bakterierna odlas varierar beroende på odlingstemperatur, men även i vilket syfte odlingen sker. Vanligen sker odling i 24 timmar (Rippa et al. 2012, Sannino et al. 2017) eller längre.

4.2.4.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem

Optimering av odling och uttryck i *P. haloplanktis* kan som vid all rekombinant proteinproduktion göras genom val av medium, temperatur och andra odlingsförhållanden. Det går i nuläget inte att optimera genom val av *P. haloplanktis*-stam då det hittills endast har utvecklats en sådan, TAC125 (Giuliani et al. 2011).

Ett välstuderat genom har lett till utveckling av flera vektorsystem

Med utgångspunkt i kartläggningen av *P. haloplanktis* proteom och genom, har ett optimeringsschema för insertion och deletion utformats. Detta i syfte att underlätta utvecklingen av nya varianter av bakterien. Dessutom har ett ganska stort antal gener för tRNA och rRNA hittats, vilket bekräftar dess förmåga till translation vid låga temperaturer (Parrilli & Tutino. 2017).

Denna forskning har gett upphov till ett antal vektorsystem, både konstitutiva och inducerbara. Ett exempel på ett inducerbart vektorsystem är pMAV-vektorn, som kan regleras med D-galaktos. Med denna vektor lyckades uttryck av det rekombinanta proteinet β -galaktosidas, till och med vid temperaturen $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, vilket är ett innovativt sätt för att uttrycka svåruttryckta proteiner. Uttrycket gav ett utbyte på 120 mg/l och var så väl reglerat att systemet även skulle kunna användas till proteiner som är toxiska för själva värden (Sannino *et al* 2017).

4.2.4.3 Utsöndring

Olösliga aggregat av rekombinanta proteiner har aldrig påträffats i *P. haloplanktis* TAC125. Detta tyder på att bakteriens veckningsprocesser är annorlunda jämfört med mesofila (ej köldtoleranta) bakterier, samt att den är lämplig för produktion av svåruttryckta proteiner (Parrilli & Tutino 2017).

Tre olika vägar för utsöndring av proteiner

P. haloplanktis är gramnegativ, vilket gör att det krävs mer arbete för utsöndring direkt till cellmediet jämfört med grampositiva bakterier. Det finns tre olika vägar ett protein kan transporteras från cytoplasman till periplasman; Sec-, Srp- eller Tat-vägen. Från analys av genomet visades att *P. haloplanktis* TAC125 innehåller alla genkodande komponenter som krävs för dessa utsöndringsvägar (Parrilli & Tutino 2017). Detta nyttjades i en studie där α -amylas från *P. haloplanktis* TAC125 användes för att utsöndra proteinet *Ph* DsbA via Sec-utsöndringsvägen. Resultatet visade lyckad utsöndring av över 80 % av de α -amylas-kopplade proteinerna, vilket ansågs högt (Cusano *et al.* 2006).

4.2.4.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

Möjlighet till kommersialisering

P. haloplanktis är en av få värdorganismer som är anpassade till kyla. Det ökande intresset för bakterien har lett till ökat antal studier kring dess genom, fysiologi samt hur den bäst fungerar för proteinframställning. På grund av detta finns idag kunskap för att kunna kommersialisera bakterien (Parrilli & Tutino 2017). I nuläget är den långt ifrån lika etablerad som andra prokaryota expressionssystem som *E. coli*, *C. glutamicum*, *L. lactis*, *R. eutropha*, *P. fluorescens* och *S. lividans*.

Komplexa proteiner har uttryckts

Trots att *P. haloplanktis* inte är så etablerad har ett stort antal proteiner uttryckts rekombinant, däribland några komplexa humana proteiner. I tabell 6 följer några exempel på uttryckta proteiner med *P. haloplanktis* som expressionssystem.

Tabell 6: Exempel på proteiner som har uttryckts i *P. haloplanktis*, med tillhörande utbyte om tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Ph DsbA	1,8 mg/l	Cusano <i>et al.</i> 2006
β -Galaktosidas	120 mg/l	Sannino <i>et al.</i> 2017
α -Glukosidas	Ingen data	Perrilli & Tutino 2017
α -amylas	Ingen data	Parrilli <i>et al.</i> 2010
β -Galaktosidas	620 mg/l	Rippa <i>et al.</i> 2012
Humant nervtillväxtfaktor (h β -NGF)	Ingen data	Vigentini <i>et al.</i> 2006
Amy Δ Ct-BlaM	Ingen data	Cusano <i>et al.</i> 2006
Antikroppsfragment (ScFv)	Ingen data	Parrilli & Tutino 2017
Humant α -galaktosidas	77.4 \pm 0,3 μ mol h ⁻¹ mg ⁻¹	Unzueta <i>et al.</i> 2015

4.2.5 *Ralstonia eutropha* – den gramnegativa bakterien med stor möjlighet till produktion av korrekt veckade proteiner

Ralstonia eutropha, även känd under namnet *Cupriavidus necator*, är en gramnegativ bakterie som är fakultativt kemolitoautotrof. Med andra ord kan den använda sig av kemisk energi som energikälla och koldioxid som kolkälla, men detta är inte ett måste (Gruber *et al.* 2016). *R. eutropha* har en mångsidig genupsättning relaterad till metabolismen vilket möjliggör tillväxt under heterotrofa*, organoautotrofa* och litoautotrofa* förhållanden (Gruber *et al.* 2016). Den är fakultativt anaerob och kan alltså utvinna energi under både anaeroba och aeroba förhållanden (Gruber *et al.* 2015).

R. eutropha är icke-patogen och kan enkelt nå en hög celldensitet vid odling i fermentor. Dessutom har stammen *R. eutropha* H16 en stor verktyglåda med genetiska verktyg för att kunna manövrera dess metabolism. Bakterien kan anpassa sig efter förändrade förhållanden och kan snabbt växla mellan heterotrofa (organiska ämnen som kolkälla) och autotrofa (koldioxid som kolkälla) förhållanden på grund av dess naturliga levnadsmiljö (Volodina *et al.* 2016).

4.2.5.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

***R. eutropha* har många alternativa odlingsförhållanden**

Under litoautotrofa förhållanden kan vätgas och koldioxid ansvara som enda energi- och kolkälla för *R. eutropha*. Bakterien kan växa till höga celldensiteter under litoautotrofa och heterotrofa förhållanden vilket främjar dess användning för proteinuttryck. Stammen *R. eutropha* H16 kan dessutom, till skillnad från exempelvis *E. coli*, odlas i högcelldensitets-fermentorer utan att samla på sig tillväxthämmande organiska syror. Detta leder till högre produktutbyte, ökad produktivitet samt minskade driftkostnader för fermenteringsprocessen (Gruber *et al.* 2016). Exempel på en fermentor som har använts är en 3-liters "Applikon, Foster City, CA" (Barnard *et al.* 2004). Odlingstemperatur är 30 °C (Barnard *et al.* 2004, Abounaga *et al.* 2018) och pH-värdet 6,8. Tiden för odling är ungefär 40 timmar (Barnard *et al.* 2004).

Olika media som *R. eutropha* odlats i

Bakterien har bland annat odlats i kvävebegränsat mineralmedium med fruktos, olja eller glycerol som kolkälla. Andra använda media är lysogeny broth (LB) och tryptic soy broth (TSB). För selektion har två typer av antibiotika, kanamycin och gentamicin, använts. De vanligaste media för stammen *R. eutropha* H16 är TSB, LB och kvävebegränsat mineralmedium innehållande sojabönlja eller fruktos.

Ofta förekommer en viss skillnad i exempelvis maximalt uttryck eller på/av-förhållandena (hur mycket genen uttrycks) beroende på vilket odlingsmedium som används. Till exempel minskade på/av-förhållandet för ett system med L-rhamnos som inducerare från 140 gånger med LB-medium till 60 gånger med mineralmedium (Abounaga *et al.* 2018).

4.2.5.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem

Två vektorsystem med reglerbar induktion i *R. eutropha*

Det finns en del konstitutiva och inducerbara promotorer för heterolog proteinexpression i *R. eutropha* (Sydow *et al.* 2017). Två inducerbara vektorsystem designades där båda uppvisade önskade reglerande egenskaper och kan användas för proteinframställning i *R. eutropha* H16. Plasmiderna som användes var pKRL-P_{j5}-egfp och pKRC-P_{j5}-egfp. Transformationen till *R. eutropha* skedde genom konjugation* med hjälp av *E. coli*, där den tidigare transformationen till *E. coli* skedde genom elektroporering*. Systemet med den förstnämnda plasmiden använder sig av isopropyl-β-d-1-thiogalactopyranosid (IPTG) som inducerare. Det andra systemet, med plasmiden pKRC-P_{j5}-egfp, använder sig av cumate-induktion med p-cumate och kräver ingen aktiv transport eftersom induceraren diffunderar genom membranet. Detta system är väldigt långsamt, men däremot är induceraren p-cumate mycket billigare än IPTG (Gruber *et al.* 2016).

Ett annat vektorsystem med många fördelar

Ett vektorsystem som kan kontrolleras mycket strikt vad gäller genuttryck är systemet med vektorn pBBR-1. En av fördelarna med detta system är att det kan kontrolleras väl med en hög dynamisk räckvidd, ungefär som ett på/av-förhållande för hur mycket genen uttrycks. Detta leder till att systemet kan användas för skadliga metaboliska vägar och produktion av toxiska proteiner. Dessutom är induceraren, doxycyklin, förhållandevis billig. Systemet är effektivt vid låga koncentrationer av induceraren vilket gör det användbart för storskalig användning. Induktionen är snabb och diffusionskontrollerad samtidigt som induceraren inte interfererar med cellens egen metabolism. Transformationen av vektorn har skett genom konjugation med hjälp av *E. coli* (Aboulnaga *et al.* 2018).

Alternativa lösningar för att undkomma problem vid proteinuttryck i *R. eutropha*

Ett system med L-rhamnos som inducerare har utvecklats för att dels möjliggöra uttryck av komplexa proteiner, men även för att undkomma de problem med plasmidförlust som förekommer vid rekombinant proteinframställning i *R. eutropha*. En alternativ lösning till detta problem är att komplettera mediet med rätt mängd antibiotika. Dock är *R. eutropha* väldigt resistent mot många olika antibiotika. En del vanligt använda antibiotika måste därför användas i väldigt höga koncentrationer, vilket leder till att bakterien begränsas när det gäller industriella fermenteringsprocesser (Sydow *et al.* 2017).

4.2.5.3 Utbyte

Med *R. eutropha* som expressionssystem har enzymet organofosfohydrolas (OPH) uttryckts lösligt och aktivt. Bakteriens celldensitet vid fermenteringen uppgick till över 10 g/l, vilket är omkring 100 gånger högre än *E. coli*. Vid uttryck av OPH i *E. coli* bildas dessutom ofta inklusionskroppar, medan *R. eutropha* GH29-8 gav ett utbyte på 69 mg/l (Barnard *et al.* 2004).

4.2.5.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

R. eutropha har kapacitet att, även under stressiga förhållanden, uttrycka proteiner med rätt veckning (Gruber *et al.* 2014). Däremot har utsöndring av heterologa proteiner i *R. eutropha* inte studerats (Gruber *et al.* 2015).

Induktionssystemet med p-cumate som inducerare i *R. eutropha* H16 anses vara ett bra alternativ för att uttrycka gener med ett högt GC-innehåll*, liksom gener som kodar för toxiska proteiner. Anledningen till detta är den hårt reglerade cumate-baserade induktionen som styr genuttrycket i bakterien. Ett exempel på ett protein som har uttryckts med detta system är EstA (Gruber *et al.* 2016).

Listade exempel på uttryckta proteiner i *R. eutropha* ses i tabell 7.

Tabell 7: Exempel på uttryckta proteiner i *R. eutropha* och tillhörande utbyte om tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Organofosfohydrolas (OPH)	69 mg/l	Barnard <i>et al.</i> 2004
EstA	Ingen data	Gruber <i>et al.</i> 2016

4.2.6 *Streptomyces lividans* – den stabilt enzymutsöndrande jordbakterien

Det grampositiva släktet *Streptomyces*

Släktet *Streptomyces* är stort och utgör nästan 5 % av de ungefär 16 000 beskrivna bakteriearterna (Spasic *et al.* 2018). *Streptomyces* är filamentösa och aeroba grampositiva jordbakterier. Eftersom bakterierna lever i jorden är de saprofyter (bryter ned organiska föreningar). Av denna anledning utsöndrar de många olika extracellulära enzymer för att kunna tillgodogöra sig polymerer såsom cellulosa och stärkelse (Sevillano *et al.* 2016). Denna förmåga utnyttjas redan i industrin och stammar från *Streptomyces*-släktet producerar över 80 % av alla bakteriella bioaktiva produkter som används i olika medicinska sammanhang (Spasic *et al.* 2018), däribland flertalet antibiotika såsom streptomycin (*Nationalencyklopedin*, streptomyceter).

Det som gör *Streptomyces* intressant i biotekniken är just dess naturliga produktion av antibiotika och andra biologiskt aktiva molekyler, dess förmåga att uttrycka gener med högt GC-innehåll*, liksom den naturliga utsöndringen av dessa. Viktig för dess tillämpningar är också den ökade kunskapen om genetiska modifieringar (Sevillano *et al.* 2016, Gabarró *et al.* 2017).

S. lividans tycks inte bilda några inklusionskroppar vid rekombinant proteinframställning

Inom släktet *Streptomyces* är det framförallt *Streptomyces lividans* som används som värd för rekombinant proteinexpression (Noda *et al.* 2010, Gabarró *et al.* 2017). Denna art har utsöndrat heterologa proteiner av både prokaryot och eukaryot härkomst (Hamed *et al.* 2017). Just *S. lividans* används främst på grund av att den inte tycks bilda inklusionskroppar, liksom sin låga produktion av endogena proteaser och brist på restriktionssystem (Chen 2012, Gabarró *et al.* 2017). De två sistnämnda innebär att nedbrytning av målproteinerna kan undvikas. Däremot innebär *Streptomyces*-släktets filamentösa karaktär en problematik vid storskalig fermentering. Detta på grund av långsam tillväxt, hög viskositet och bildandet av stora klumpar som gör det svårt att skapa en homogen odling (Sevillano *et al.* 2016).

Nyttjandet av utsöndringsvägar hos *S. lividans*

Precis som andra grampositiva bakterier, har även *S. lividans* olika utsöndringsvägar. Vid rekombinant proteinframställning i *S. lividans* sammansvetsas vanligtvis den heterologa genen till en signalpeptidsekvens, som normalt är kopplad till ett annat naturligt protein med hög expression och utsöndring. Därmed kan signalpeptiden trigga transporten av det önskade proteinet till cellmembranet och möjliggöra utsöndring direkt till mediet (Gabarró *et al.* 2017, Hamed *et al.* 2017). Vanligast är att utnyttja den generella Sec-utsöndringsvägen. Dock har även Tat-utsöndringsvägen använts för heterolog proteinframställning i *Streptomyces* och kan vara en alternativ lösning för de proteiner som inte kan uttryckas via Sec-utsöndringsvägen (Liu *et al.* 2013).

4.2.6.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

Den förhållandevis långsamma tillväxten hos *Streptomyces* kan begränsa och fördröja en storskalig fermentering. Dessutom går det åt mer material och energi än hos många andra industriellt använda bakteriestammar (Liu *et al.* 2013). Odling med filamentösa kulturer såsom *Streptomyces* resulterar i viskösa och klumpformande kulturer vilket är ogynnsamt för industriell fermentering (Sevillano *et al.* 2016).

I solida kulturer är *Streptomyces* livscykel generellt sett problematisk då kedjor av sporer bildas, därför är det viktigt att separera tillväxtfas och produktionsfas med inducerbara promotorer (Liu *et al.* 2013). Exempel på hur sådana problem delvis kan kringgås finns under rubriken "Optimeringsmetoder". Här följer en sammanställning av odlingsförhållanden och utrustning som använts vid lyckade proteinuttryck i *S. lividans*.

Det finns flertalet stammar av *S. lividans*

Exempel på stammar av *S. lividans* som använts som utgångspunkt för rekombinant proteinframställning är *S. lividans* JT46, *S. lividans* JT66 (Liu *et al.* 2013), *S. lividans* 1326 (Noda *et al.* 2010, Noda *et al.* 2015, Sevillano *et al.* 2016), *S. lividans* TK21 (Gabarró *et al.* 2017) och *S. lividans* TK24 (Hamed *et al.* 2017).

Protoplaster bildas innan transformation

För att introducera de designade plasmiderna skapas protoplaster (celler utan cellvägg) av *S. lividans* genom behandling med lysozym. Därefter sker transformation med hjälp av polyetylen glykol (PEG*). Selektion av transformerade celler utförs genom selektion för antibiotikaresistens, ofta med kanamycin (Noda *et al.* 2010, Hamed *et al.* 2017).

Flera val av odlingsmedium

Vilket odlingsmedium som används varierar mellan olika studier. Det vanligaste verkar vara tryptic soy broth (TSB) (Noda *et al.* 2010, Noda *et al.* 2015). Produktiviteten av proteinet CelA har studerats i olika medium, nämligen MM, MMC₅, MMC₁₅, TSB, Bennet, NB, NB_{2x}. Det visade sig att nutrient broth (NB) resulterade i klart högst proteinproduktivitet av dessa. NB-mediet har ett pH på 6,9 och innehåller 5 g/l pepton och 3 g/l biffextrakt (Hamed *et al.* 2017).

Optimala odlingsförhållanden och fermentorer

Odlingen och fermenteringen av *S. lividans* sker vid pH mellan 6,8 och 7,0 (Gabarró *et al.* 2017, Hamed *et al.* 2017) och temperaturer mellan 28 och 30 °C. Cirkulation sker med omkring 200 rpm vid odling i E-kolv och omkring 500 rpm i fermentor. Mannitol eller glukos används som kolkälla och trypton som kvävekälla. Odling eller fermentering av *S. lividans* är tämligen tidskrävande och pågår i upp till 7 dagar (Noda *et al.* 2010, Hamed *et al.* 2017).

Ett exempel på använda fermentorer är 1-liters ”Eppendorf DASGIP Parallel Bioreactor System”, i denna testades olika medium som tas upp ovan (Hamed *et al.* 2017). Ett annat exempel är 3-liters respektive 7-liters ”Applikon Bioreactor”, där den större användes för fermentering med näringstillsats under fermenteringsförloppet (Gabarró *et al.* 2017).

4.2.6.2 Optimeringsmetoder

Optimeringsmetoder som kan tillämpas för *S. lividans* är bland annat följande:

- Hitta starka inducerbara promotorer för att skilja på tillväxtfas och produktionsfas (Chen 2012, Liu *et al.* 2013)
- Val och modifiering av signalpeptider för att optimera utsöndring (Noda *et al.* 2010, Chen 2012, Hamed *et al.* 2017)
- Val av odlingsmedium och odlingsförhållanden (Gabarró *et al.* 2017, Hamed *et al.* 2017)
- Påverka tillväxten och celldelningen hos *S. lividans* (Liu *et al.* 2013, Sevillano *et al.* 2016)
- Övriga genetiska optimeringar (Gabarró *et al.* 2017)
- Morfologiska modifieringar (Chen 2012)

Starka inducerbara promotorer gynnar proteinuttryck

Genom att välja starka promotorer kan proteinuttrycket optimeras. Vid uttryck av industriella proteiner från andra arter – xylanas från *Streptomyces halstedii*, α -amylas från *Streptomyces griseus* och litet lackas (*eng.* small laccase) från *Streptomyces coelicolor* – testades olika promotorer. Det visade sig att xysAp från *S. halstedii* JM8 var gynnsam. Denna promotors inducerare är olika kolkällor såsom xylos, xylan eller fruktos och dess repressor* är glukos. Även pstSp från *S. lividans*, som induceras av låga fosfatförhållanden och av olika kolkällor såsom fruktos, xylos eller galaktos, var bland de mest effektiva och gynnade produktionen. Båda dessa fungerade bättre än de vanligtvis använda *Streptomyces*-promotorerna ermE*_p och vsip (Sevillano *et al.* 2016).

Olika signalpeptider har olika utsöndringseffektivitet

En annan stor optimeringsmöjlighet är att välja bra signalpeptider eller modifiera dessa. Exempelvis har det visat sig vara fördelaktigt för utsöndring av xylanas att byta ut xylanas-signalpeptiden mot en amylas-signalpeptid (Sevillano *et al.* 2016). För flertalet andra proteinuttryck i *S. lividans* har en lyckad metod varit att använda transkriptionselement och signalpeptid som normalt tillhör ett subtilisin-inhibitorprotein från *Streptomyces venezuelae*

CBS762.70. Exempelvis utnyttjades detta vid utsöndring av termostabilt cellulas (CelA), där designen tillämpades genom plasmiden pIJ486_ *vsi-celA* (Hamed *et al.* 2017).

Vid uttryck av transglutaminas, β -glukosidas och endoglukanas i *S. lividans* användes signalpeptiden från fosfolipas D (PLD) hos *Streptovorticillium cinnamoneum*. Detta antydde att PLD är användbar för utsöndrat uttryck av heterologa proteiner i *S. lividans*, då ett vektorsystem med denna signalpeptid gav betydligt högre produktion än tidigare studier (Noda *et al.* 2010).

Val av odlingsmedium och odlingsförhållanden påverkar expressionen

Vid uttryck av proteinet CelA i *S. lividans* testades också olika odlingsmedium (MM, MMC₅, MMC₁₅, TSB, Bennet, NB, NB_{2x}), där nutrient broth (NB) eller nutrient broth, dubbel styrka (NB_{2x}) visade sig vara det klart bästa för att optimera proteinutsöndring (Hamed *et al.* 2017). En annan studie gjorde också jämförelse av fermentering med och utan näringstillsatser under fermenteringens gång. Detta visade att näringstillsatser under fermenteringsprocessen var fördelaktigt ur produktivitetssynpunkt, särskilt med två successiva mannitol-tillsatser som kolkälla (Gabarró *et al.* 2017).

Den problematiska tillväxten och celledelningen kan påverkas till det bättre

Problem som är kopplade till fermentering av filamentösa organismer är långsam tillväxt, hög viskositet, problem med blandning på grund av stora mycel-klumpar och komplex reningsprocess. En del av denna problematik kan undvikas genom ökat uttryck av proteinet SsgA i *S. lividans* då detta protein gynnar fragmenterad tillväxt på grund av ökad celledelning. Samma protein har även visat sig påverka utsöndringsmaskineriet positivt. Ökat uttryck av SsgA i *S. lividans* ökade den rekombinanta produktionen av xylanas med 40 % och amylas med 70 % (Sevillano *et al.* 2016).

Flera genetiska modifieringar kan gynna proteinuttrycket

Deletion av andra gener kan optimera värdens proteinuttryck, däribland signalpeptidas vars främsta uppgift är att klyva signalpeptiden. Exempelvis har studier av en muterad stam av *S. lividans* (TK21Y62) med defekt signalpeptidas SipY gjorts för expression av protein som utsöndras via Tat-utsöndringsvägen. Den SipY-defekta mutanten visade sig bland annat ha fördelar vad gäller extracellulär produktivitet och specifik aktivitet* i jämförelse med vildtyp (Gabarró *et al.* 2017).

Det har också visats att *S. lividans*-mutanter med borttagna repressorer kan vara gynnsamt. Exempelvis visade en variant av *S. lividans* med borttagen repressor BxIR en stor förbättring för uttryck av proteinet litet lackas (*eng.* small laccase) (Sevillano *et al.* 2016).

4.2.6.3 Utbyte och renhetsgrad

Flera proteiner, däribland många enzymer med termostabilitet och hög specificitet, har uttryckts med högt utbyte och renhet. Det tetramera proteinet streptavidin från *Streptomyces avidinii* uttrycktes med termostabilitet till ett utbyte av 56 mg/l (Noda *et al.* 2015). Cellulaset CelA från *Rhodothermus marinus* uttrycktes med 100–120 mg/g torr cellvikt* eller 50–90 mg/l, och renades till 98 % renhet (Hamed *et al.* 2017).

Proteinerna transglutaminas från *Streptoverticillium cinnamoneum* samt β -glukosidas och endoglukanas från *Thermobifida fusca* YS har uttryckts i *S. lividans* med utbyte på 64,3 mg/l, 114,4 mg/l respektive 230 mg/l utsöndrat till mediet (Noda *et al.* 2010).

4.2.6.4 Exempel på uttryckta proteiner

Uttryck av Streptavidin med bibehållen affinitet och cellulas med bibehållen termostabilitet

Streptavidin är ett tetramert protein med specifik affinitet för biotin och med biotekniska tillämpningar, tidigare rekombinant framställt med *E. coli*. Streptavidin från *Streptomyces avidinii* har nu uttryckts rekombinant i *S. lividans* och utsöndrats med sin tetramera form och bibehållen affinitet för biotin. Dessutom hade det uttryckta Streptavidin termostabilitet och behöll sin affinitet efter kokning, vilket inte är fallet för naturligt tetramert Streptavidin. Produktiviteten av Streptavidin med detta *S. lividans*-system var 9,2 gånger högre (5,6 mg från 100 ml odlingsmedium) än det jämförda *E. coli*-systemet (0,61 mg från 100 ml odlingsmedium). Sannolikt kan detta *S. lividans*-system också användas för utsöndring av andra multimeriska proteiner* (Noda *et al.* 2015).

Ett annat enzym som uttryckts med bibehållen termostabilitet är ett cellulas (CelA) från *Rhodothermus marinus*. Detta protein utsöndrades av *S. lividans* TK24. Under optimala förhållanden utsöndrades 50–90 mg/l till mediet efter 7 dagar. Detta kan jämföras med syntes av CelA i *E. coli*, där en del stammar kunnat uttrycka små mängder och en del stammar inte lyckats syntetisera något alls (Hamed *et al.* 2017).

Högt utbyte av lösligt protein som inte lyckats uttryckas i *E. coli*

Transglutaminas uttrycktes genom utsöndring från *S. lividans* med ett utbyte av 230 mg/l, medan *E. coli* bildar inklusionskroppar vid uttryck av samma protein. Den återveckningsprocess som då krävs minskar aktiviteten hos transglutaminaset från *E. coli*, medan *S. lividans* utsöndrar proteinet fullt veckat och aktivt direkt (Noda *et al.* 2010).

Exempel på uttryckta proteiner i *S. lividans*

Listade exempel på proteiner som har uttryckts i *S. lividans* ses i tabell 8.

Tabell 8: Exempel på uttryckta proteiner i *S. lividans* med tillhörande utbyte om data finns tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Transglutaminas (Tgase) från <i>Streptovericillium cinnamoneum</i>	230 mg/l	Noda <i>et al.</i> 2010
β -glukosidas från <i>Thermobifida fusca</i> YS	114,4 mg/l	Noda <i>et al.</i> 2010
Endoglukanas från <i>Thermobifida fusca</i> YS	64,3 mg/l	Noda <i>et al.</i> 2010
CelA från <i>Rhodothermus marinus</i>	50–90 mg/l	Hamed <i>et al.</i> 2017
Xyloglukanas från <i>Jonesia sp.</i> (kräftdjur)	Ingen data	Hamed <i>et al.</i> 2017
Xylanas från <i>Streptomyces halstedii</i>	Ingen data	Sevillano <i>et al.</i> 2016
α -amylas från <i>Streptomyces griseus</i>	Ingen data	Sevillano <i>et al.</i> 2016
Litet lackas (<i>eng.</i> small laccase) från <i>Streptomyces coelicolor</i>	Ingen data	Sevillano <i>et al.</i> 2016
Streptavidin från <i>Streptomyces avidinii</i>	56 mg/l	Noda <i>et al.</i> 2015

4.3 Eukaryota expressionssystem

De eukaryota expressionssystem som studerats är svampsläktet *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*), grönalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, jästen *Hansenula polymorpha*, parasiten *Leishmania tarentolae*, mossan *Physcomitrella patens* och slutligen suspensionsbaserad växtcellsodling. I bilaga 1 listas också andra eukaryota expressionssystem som till en början tycktes intressanta, men som av olika anledningar utslöts från vidare studier.

4.3.1 *Aspergillus* – svampsläktet som briljerar inom enzymindustrin

Aspergillus är ett svampsläkte som spelar en viktig roll inom industrin. De används för produktion av heterologa och homologa enzymer, såsom cellulaser och amylaser. Släktet innefattar omkring 340 arter varav fem är stora inom biotekniken, framförallt för fermentering av livsmedel, enzym- och läkemedelsproduktion. Dessa är *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* och *Aspergillus awamori* (Park *et al.* 2017). Av dessa är *A. niger* och *A. oryzae* klassade som GRAS* av amerikanska livs- och läkemedelsverket (*eng.* Food and Drug Administration, FDA) (Lubertozzi & Keasling 2009). På senare tid har däremot skadliga sekundärmetaboliter upptäckts i vissa stammar av *A. niger*, till exempel ochratoxin A, och det är därför viktigt att undersöka kapaciteten att producera skadliga ämnen hos varje industriellt gångbar stam (Park *et al.* 2017).

Anledningen till *Aspergillus* stora framgång vid enzymproduktion är att de naturligt kan utsöndra stora mängder endogena enzymer, till exempel mer än 20 g/l amylas. Utbytena vid heterolog proteinproduktion har dock inte uppnått lika höga nivåer. *Aspergillus* har ett eukaryot posttranslationellt maskineri, men dess glykosyleringsmönster skiljer sig mer från däggdjurscellers än högre eukaryoter såsom växter gör (Wiebe *et al.* 2001).

4.3.1.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

Filamentösa svampar har inga naturligt förekommande plasmider och de har ofta svårt att bibehålla en självkopierande plasmid i flera generationer. Om ett stabilt uttryck av en rekombinant gen ska bibehållas under en längre tid är det vanligt att dess DNA inkorporeras i värdens genom. För att göra detta är de två vanligaste transformationsmetoderna polyetylenglykol- (PEG-) medierad transformation och elektroporering*. Andra metoder som förekommer är så kallad mikroprojektilbombardering (*eng.* gene gun transformation) och *Agrobacterium tumefaciens*-medierad transformation (Su *et al.* 2012). Dessa två metoder förklaras ingående i avsnitt 5.3.2.2 respektive 5.3.6.3.

Olika arter har olika krav på odlingsparametrar

Aspergillus har generellt en optimal odlingsstemperatur mellan 30 och 40 °C och pH omkring 6,5. Tiden för att aktivera sporer och fermentering varierar mellan olika underarter. Den beror också på vilken typ av odlingsutrustning som används, exempelvis huruvida roterande flaskor eller fermentorer används. Normalt brukar denna fermenteringstid variera mellan 3–7 dagar. *Aspergillus* kräver en syrerik miljö och odlingstiden är kortare än för däggdjursceller (Legastelois *et al.* 2016). Odlingsmedierna är generellt billiga och baseras på kolhydrater såsom fruktos, glukos, melass eller stärkelsehydrolysater (Najafpour 2007). Följande odlingsförhållanden är exempel från experiment och resultat från optimeringsstudier för olika underarter av *Aspergillus*:

- *A. niger* har optimal odlingsstemperatur mellan 24 och 37 °C, optimala pH-värden är mellan 4 och 6,5 (Passamani *et al.* 2014) och fermenteringen för en sats (*eng.* batch) tar sju dagar i fermentor (Priede *et al.* 2002).
- *A. oryzae* kan odlas i 30 °C och pH 5,5 under fem dagar i så kallat Czapek Dox-medium i skakflaskor, ett vanligt förekommande medium för odling av *Aspergillus* (Sugano *et al.* 2000).

Aspergillus odlas i fermentorer

Det vanligaste sättet att odla *Aspergillus* i industrin är i fermentorer eftersom parametrar såsom pH, temperatur och näringshalt är enkla att kontrollera, vilket förenklar uppskalningsprocessen. Designen på fermentorn och omrörningen är viktig för att få en så effektiv syretillförsel som möjligt och det påverkar även organismens tendens att antingen bilda mycel (filamentösa trådar) eller klumpa ihop sig till pellets. De olika morfologierna påverkar effektiviteten av proteinproduktionen och optimeringsarbete är således viktigt vid det här steget i processen (Musoni *et al.* 2015). Företaget “Belach Bioteknik” säljer fermentorer anpassade för svampar, till exempel omrörningsfermentormodellen (*eng.* stirred-tank bioreactor) “Lars”, men även luftomrörningsfermentorer (*eng.* air-lift bioreactor) som inte skadar cellerna lika mycket (Gizella Szabo, muntligen).

4.3.1.2 Optimering – det största problemet är en ineffektiv utsöndring av heterologa proteiner

En stor fördel med *Aspergillus* är att de utsöndrar artegna proteiner naturligt på ett effektivt sätt, vilket gör att de slipper extraheras från cellerna. När det däremot gäller uttryck av heterologa proteiner blir utbytet 10–1000 gånger lägre än för de artegna proteinerna (Su *et al.* 2012). Det finns ett antal olika parametrar som kan ligga bakom detta problem.

Proteaser i omgivningen bryter ner målproteinerna

Ett av dessa problem är att *Aspergillus* producerar en stor mängd extracellulära proteaser, vilka kan bryta ner det rekombinanta proteinet efter att det utsöndrats i mediet. Optimeringsarbete har gjorts genom att skapa nya stammar där generna för några proteaser är borttagna eller nedreglerade. I en studie slogs fem gener för proteaser i stammen *A.*

oryzae KBN616 ut, vilket reducerade proteasaktiviteten till 1 % jämfört med ursprungsstammen. Den nya stammen fick namnet K04 (Kitamoto *et al.* 2015).

Samuttryck av fusionsproteiner och chaperoner kan effektivisera utsöndringen

Ett annat sätt att effektivisera utsöndringen är med hjälp av endogena fusionsproteiner*. Detta är proteiner eller proteinfragment som värden själv kan producera och som uttrycks tillsammans med målproteinet. Tanken är att fusionsproteinet som används ska kunna utsöndras mycket effektivt i värdcellen. Ett exempel på ett sådant protein är α -amylas i *A. oryzae* eller *A. niger*. Detta fusionsprotein uttrycktes tillsammans med heterologa däggdjursproteiner och ökade proteinproduktionen tusenfalt (Su *et al.* 2012).

En annan optimeringsstrategi kan vara att samuttrycka det heterologa proteinet med chaperoner, det vill säga proteiner som hjälper målproteinet att få rätt veckning. *Aspergilli* tenderar nämligen att bryta ner proteiner som är felveckade eller har fel glykosyleringsmönster via en mekanism som kallas för UPR (*eng.* Unfolded Protein Response). Uppreglering av chaperoner kan således leda till ett större antal korrekt veckade målproteiner (Su *et al.* 2012).

I en studie testades samuttryck av manganeperoxidas (MnP1) tillsammans med två olika chaperonproteiner, nämligen kalnexin och det bindande proteinet BiPA, i *A. niger* MGG026. Överuttryck av kalnexin gav 4–5 gånger högre utsöndring av MnP1 än tidigare, men effekten från uppreglering av BiPA hade istället en negativ effekt på utsöndringen av MnP1 (Conesa *et al.* 2002). En annan studie visade emellertid att uttrycket av växtproteinet thaumatin i *A. awamori* drygt fördubblades när BiPA uppreglerades (Lombraña *et al.* 2004). Detta illustrerar komplexiteten i optimeringsarbetet kring heterolog proteinproduktion – alla proteiner är olika och det finns ingen generell lösning som fungerar för alla proteiner (Hoang *et al.* 2015).

4.3.1.3 Vektorsystem – promotorer och selektionsmarkörer

Selektionsmarkörer till en rad olika vektorsystem

En rad olika vektorsystem har utvecklats för *Aspergillus* med diverse selektionsmarkörer och promotorer, både konstitutiva och inducerbara. Exempel på selektionsmarkörer är resistensgener mot antibiotika, såsom hygromycin och kanamycin. Det är även vanligt med näringsbaserade markörer. Dessa innebär att endast de celler som transformerats har förmågan att växa i mediet (Gómez *et al.* 2016).

Vektorer som kan användas i både *E. coli* och underarter av *Aspergillus*

Några vanligt förekommande promotorer är *glaA*, *alcA* och *pkiA* (Gómez *et al.* 2016). Det finns även kompletta vektorsystem kommersiellt tillgängliga från exempelvis Takara Bio USA, där färdiga plasmider kan beställas. Dessa heter pPTR I respektive pPTR II och kan användas i både *E. coli* och underarter av *Aspergillus* (Takara Bio USA).

Vektorer som gett funktionella proteiner

Några exempel på vektorer som utvecklats i studier är ANIp1, ANIp4, ANEp1, ANEp5, ANEp7 och ANEp8. Dessa vektorer kunde användas för att uttrycka omkring 40 % av 87 olika heterologa proteiner utifrån cDNA i *A. niger*. Alla dessa proteiner var dessutom biologiskt funktionella (Storms *et al.* 2005).

4.3.1.4 Exempel på uttryckta proteiner och utbyte

Som tidigare nämnts är *Aspergillus* ett släkte av stor vikt inom industrin. De verkligt höga produktmängderna fås dock vid produktion av metaboliter eller homologa proteiner, såsom citronsyra och amylas, medan nivåerna är betydligt lägre vid heterologt uttryck. Su *et al.* sammanfattade i en recensionsartikel ett antal heterologa proteiner och erhållet utbyte från olika filamentösa svampar i olika studier (Su *et al.* 2012). Se tabell 9 för proteiner uttryckta i *Aspergillus*.

Tabell 9: Exempel på proteiner som har uttryckts i tre underarter av *Aspergillus*

Organism	Protein	Utbyte	Referens
<i>A. awamori</i>	Humant laktoferrin	2000 mg/l	Ward <i>et al.</i> 1995
<i>A. niger</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> manganesperoxidaser	100 mg/l	Punt <i>et al.</i> 2002
<i>A. niger</i>	Humant interleukin-6	15 mg/l	Broekhuijsen <i>et al.</i> 1993
<i>A. niger</i>	Humant plasminogenaktivator	25 mg/l	Wiebe <i>et al.</i> 2001
<i>A. oryzae</i>	Bovint kymosin	150 mg/kg fast medium (vete)	Tsuchiya <i>et al.</i> 1994

4.3.2 *Chlamydomonas reinhardtii* – den snabbväxande grönalgen

Encelliga eukaryota grönalger, även kallade mikroalger, har förmågan att syntetisera kemiska energibärare såsom proteiner, lipider och kolhydrater. De senaste åren har mikroalger blivit en intressant produktionsplattform som fabriker för rekombinant proteinframställning (Gong *et al.* 2011).

C. reinhardtii – ett av de mest etablerade modellsystemen som kan utföra komplexa posttranslationella modifieringar

Mikroalgen *Chlamydomonas reinhardtii* är ett av de mest etablerade modellsystemen av mikroalger för rekombinant proteinuttryck, förlagt antingen i kloroplasten eller i cellkärnan. Molekylära verktyg för att göra detta är utvecklade och finns tillgängliga (Carrera Pacheco *et al.* 2018).

Av alla mikroalger är *C. reinhardtii* också den bäst karakteriserade. Den har många av de egenskaper som önskas hos ett expressionsystem för rekombinant proteinframställning. Algen odlas billigt och enkelt samtidigt som den har en snabb tillväxt jämfört med andra växter (Rosales-Mendoza *et al.* 2012). Dessutom kan den utföra komplexa posttranslationella modifieringar (Gong *et al.* 2011), vilket är nödvändigt främst vid uttryck av eukaryota proteiner.

C. reinhardtii är GRAS-klassificerad* (Rosales-Mendoza *et al.* 2012). Detta baseras på att mikroalger är fria från bakteriepatogener, humana patogener, och endotoxiner (Carrera Pacheco *et al.* 2018).

Uttryck i kloroplasten kan ge rätt veckade proteiner

Varje algcell innehåller en enda stor kloroplast som utgör cirka 40 % av hela cellvolymen (Rosales-Mendoza *et al.* 2012). Särskilt kloroplasten är av intresse för att uttrycka proteiner i *C. reinhardtii*, detta eftersom uttryck i cellkärnan har visat sig ge lägre proteinuttryck (Gong *et al.* 2011). Kloroplasten har ett genom som är 205 kb stort och innehåller endast 99 gener (Dyo & Purton 2018). Uttryck i kloroplasten kan generera rätt veckade proteiner och forma disulfidbryggor (Carrera Pacheco *et al.* 2018). En nackdel med uttryck i kloroplasten är dock att den inte kan utföra glykosylering av proteiner. Uttryck i kloroplasten passar därför rekombinanta proteiner som inte behöver glykosylering för att vara funktionella (Shamriz & Ofoghi 2016).

4.3.2.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

C. reinhardtii kan odlas i fotofermentorer (fermentorer med ljusstillsförel) (Dyo & Purton 2018) under kontrollerade förhållanden med avseende på temperatur, pH och näringsämnen. Odling i fermentorer förhindrar spridning av transgener* till omgivningen, vilket kan vara ett problem vid odling av högre eukaryota växter (Gong *et al.* 2011).

Kan odlas både heterotroft och fotoautotroft

C. reinhardtii har också förmågan att odlas under både hetero- och fotoautotrofa* förhållanden. Under fotoautotrofa förhållanden används koldioxid som kolkälla (Carrera Pacheco *et al.* 2018) och under heterotrofa förhållanden används ofta acetat som kolkälla (Rosales-Mendoza *et al.* 2012). Modifierade stammar av *C. reinhardtii* skulle dock kunna odlas med glukos eller sackaros som kolkälla (Dyo & Purton 2018). Optimal temperatur för odling av *C. reinhardtii* ligger runt 20–32 °C (Xie *et al.* 2013).

Tidsåtgång

Generellt sett tar det 24 timmar för mikroalger att dubblera sin biomassa. Från generering av transgena mikroalg-kloroplaster till uppskalning av volymer för storskalig produktion tar det därför några veckor (Gong *et al.* 2011). Det tar omkring 2–4 veckor att generera transgena cellinjer av mikroalger. Det odlingsmedium som används består huvudsakligen av oorganiska salter och bovint serumalbumin (BSA). Tillväxthastigheten för alger liknar den för jäst (Carrera Pacheco *et al.* 2018).

4.3.2.2 Hur går transformation i kloroplasten till?

För transformation av mikroalger utnyttjas ofta cellernas förmåga att temporärt tillåta genomsläpp av DNA-molekyler genom cellväggen. Detta sker utan att cellen dör. Metoden som ofta används kallas för mikroprojektilbombardering (*eng.* gene gun transformation). Denna går ut på att guld eller tungsten belagda med DNA används som mikroprojektiler för att föra in DNA i cellerna, med hjälp av en särskild apparat. Detta fungerar för de flesta celler oberoende av hur fast eller tjock cellväggen är. Det finns många rapporter om framgångsrik transformation vid användning av denna metod. Även kloroplaster och mitokondrier har transformerats med hjälp av denna metod (Gong *et al.* 2011).

Kloroplastens genom med många kopior

Kloroplasten har ett helt eget genom och varje kloroplast har cirka 80 kopior av detta. För att uppnå stabil transformation bör alltså alla 80 genomkopior omvandlas till den rekombinanta formen. Detta görs ofta genom homolog rekombination (Rosales-Mendoza *et al.* 2012) och möjliggör precis integrering av DNA i plastomet (kloroplasternas genom) (Dyo & Purton 2018). I kloroplasten sker alltså transformationen genom homolog rekombination, till skillnad från transformation i cellkärnan där genomet integreras slumpvis (Gong *et al.* 2011).

Elektroporering* används för celler av *C. reinhardtii* som modifierats eller är annorlunda på så vis att de har en tunn, eller helt saknar, cellvägg. Även polyetylenglykol- (PEG*) eller *Agrobacterium tumefaciens*-baserade metoder kan användas för transformation av *C. reinhardtii* (Gong *et al.* 2011).

4.3.2.3 Optimering – för att öka utbytet

Proteinutbytet kan optimeras på många sätt

För att öka utbytet av rekombinanta proteiner undersöks sätt att optimera expression i *C. reinhardtii* (Gong *et al.* 2011). Nivåerna för proteinuttryck i kloroplasten av *C. reinhardtii* ligger generellt sett omkring 0,02–5 % av totalt lösligt protein* (TSP). För en kommersiell plattform krävs ofta att utbytet är >10 % av totalt lösligt protein (Dyo & Purton 2018). Effektiviteten hos proteinproduktion i *C. reinhardtii* kan alltså fortfarande förbättras signifikant (Carrera Pacheco *et al.* 2018). Uttrycksnivåerna av rekombinant protein påverkas av många faktorer, såsom val av promotor, reglerande element, proteaser och genavstängning* (Gong

et al. 2011). Omkring 20 ATP-beroende proteaser tros vara ansvariga för nedbrytningen av proteiner i kloroplasten (Carrera Pacheco *et al.* 2018).

Exempel på promotorer som ofta används för uttryck av heterologa proteiner i *C.reinhardtii* är

- Promotor från virus som infekterar blomkål (*CaMV35S*)
- Endogena promotorer *RbcS2* och *PsaD*
- Endogen promotor *Hsp70A* (stressprotein *eng.* heat-shock protein) (Gong *et al.* 2011)

Samuttryck med introner

Även icke-translaterade regioner (UTRs) och introner kan spela en stor roll i stabilitet och effektivitet av uttryck av heterologa gener. En intron från genen *RbcS2* visade sig öka uttrycket av bakteriegenen *Ble* då den integrerades till *Ble*-genen vid uttryck i *C. reinhardtii* (Gong *et al.* 2011).

Kodonoptimering

Även kodonoptimering* har visat sig vara framgångsrikt för att öka uttrycket av rekombinanta proteiner i algkloroplaster (Gregory *et al.* 2016). Generellt sett leder ökad förståelse för genreglering i kloroplasten, liksom utvecklingen av molekylära strategier, till högre proteinutbyten (Dyo & Purton 2018).

Ljusperioder kan öka proteinutbytet signifikant

C. reinhardtii är mixotrof och kan alltså utvinna energi från både fotosyntes och organiska energikällor. Uttryck under fotoautotrofa förhållanden har dock visat sig ge högre utbyte än under mixotrofa eller heterotrofa förhållanden (Carrera Pacheco *et al.* 2018). Genuttryck i kloroplaster regleras till stor del av ljus. Dess intensitet samt kontinuitet och olika ljusperioder kan därför påverka rekombinant proteinproduktion i *C. reinhardtii* signifikant. Den optimala ljusperioden under fotoautotrofa förhållanden för uttryck av grönt fluorescerande protein (GFP) visade sig vara 9 timmar per dag. Efter 5 dagar var då utbytet av GFP 6,0 mg/l och utbytet av GFP-PlyGBS 2,1 mg/l. Detta motsvarade alltså cirka 1,2 mg/l för GFP respektive 0,42 mg/l för GFP-PlyGBS per dag (Carrera Pacheco *et al.* 2018).

4.3.2.4 Exempel på uttryckta proteiner

Många produkter befinner sig fortfarande i forskningsstadiet

Över 40 olika lösliga och bioaktiva terapeutiska proteiner har framgångsrikt uttryckts i kloroplasten hos *C. reinhardtii*. Däribland humant växthormon, terapeutiska cancerproteiner, autoantigener och antibakteriella enzymer (Dyo & Purton 2018). De flesta rekombinanta produkter från *C. reinhardtii* är fortfarande i forsknings- och utvecklingsstadiet. Det är bara några få av dessa produkter som testats på djur (Shamriz & Ofoghi 2016).

År 2011 fanns inga rekombinanta proteiner producerade i mikroalger tillgängliga på marknaden. Däremot ses mikroalger som ett framtida alternativ för kommersiell produktion

av rekombinanta proteiner för användning i terapeutiskt eller industriellt syfte (Gong *et al.* 2011).

Kostnaden för att producera antikroppar i mikroalger uppskattades år 2011 till 0,002 amerikanska dollar per gram. Detta kan jämföras med produktion av rekombinanta antikroppar i däggdjursceller som uppskattats till 150 amerikanska dollar per gram (Gong *et al.* 2011).

En attraktiv plattform för uttryck av allergener

Ett område där GRAS-klassificeringen av *C. reinhardtii* kan vara användbar är inom allergenspecifik immunterapi (Dyo & Purton 2018), eftersom det möjliggör oralt intag av algen. Ett jordnötsallergen, Ara h 1, som framgångsrikt uttrycktes i *C. reinhardtii* orsakade akut allergisk reaktion i mus (Gregory *et al.* 2016). Växter är en attraktiv plattform för att producera just allergener eftersom många av dessa finns i, eller härstammar från, olika typer av växter.

För exempel på uttryckta proteiner i *C. reinhardtii* kloroplast, se tabell 10.

Tabell 10: Exempel på proteiner uttryckta i *C. reinhardtii* och utbyte om tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Fusionsprotein* innehållande virus som orsakar höstblåsor (FMVD) och koleratoxin B-subenhet (CTB)	3 % TSP	Sun <i>et al.</i> 2003
Hög mobilitet grupp protein B1 (HMGB1)	2,5 % TSP	Rasala <i>et al.</i> 2010
Bovine mammary-associated serum amyloid (M-SAA)	5 % TSP	Manuell <i>et al.</i> 2007
Ara h 1 – jordnötsallergen	Ingen data	Gregory <i>et al.</i> 2016
IgG1 human monoklonal antikropp (mAb)	100 µg renat protein per gram torr biomassa	Gong <i>et al.</i> 2011

4.3.3 *Hansenula polymorpha* – den termotoleranta jästen som är ett bra val för uttryck av instabila och känsliga proteiner

Hansenula polymorpha är en termotolerant (Stasyk 2017), aerob (Dusny & Schmid 2016) jäst som kan växa i upp till 45 °C och ibland även vid högre temperaturer. Den är dessutom resistent mot tungmetaller och oxidativ stress. Detta gör den väl anpassad för att producera rekombinanta proteiner som är termostabila (Stasyk 2017). Den optimala temperaturen för tillväxt är 37–43 °C. Denna relativt höga temperatur kan vara till fördel vid uttryck av däggdjursproteiner och reducerar dessutom risken för kontaminering vid storskalig fermentering (Nel *et al.* 2009). Jäst kan utföra både O-länkad glykosylering i golgiapparaten och N-länkad glykosylering i endoplasmiskt retikulum (ER). Just *H. polymorpha* är en bra kandidat för rekombinant proteinframställning på grund av dess sällsynt förekommande

hyperglykosylering* (Adivitiya *et al.* 2017). Jästen är även ansedd som säker för rekombinant proteinproduktion, då den blivit GRAS-klassificerad* (Wetzel *et al.* 2018).

4.3.3.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

***H. polymorpha* har olika metaboliska vägar och kan uppnå höga celldensiteter**

H. polymorpha omsätter metanol som kol- och energikälla på samma sätt som den etablerade jästen *P. pastoris* gör, men har utöver det också en metabolisk väg för nitratupptag (Çelik & Çalık 2012). Jästen kan även fermentera xylos vid höga temperaturer och har använts i 50-liters fermentorer (Adivitiya *et al.* 2017). På samma sätt som för *P. pastoris* kan *H. polymorpha* uppnå höga utbyten i biomassa vid odling i fermentorer (Stasyk 2017). Genom användning av *H. polymorpha* som expressionssystem och vid odling i fermentorer kan höga celldensiteter på 150 g/l torr cellvikt* uppnås (Bredell *et al.* 2016).

Exempel på odlingsförhållanden vid uttryck av olika proteiner

Vid uttryck av ett rotavirus VP6-protein användes stammen *H. polymorpha* NCYC 495. Transformationen skedde genom elektroporering*. Fermenteringen ägde rum i 1,3-liters fermentorer av märket "New Brunswick Bioreactors" med temperaturen 37 °C, pH-värdet 5,0 och med 30 % löst syre (Bredell *et al.* 2016).

Vid rekombinant produktion av streptavidin i *H. polymorpha* fermenterades jästen i "Sixfors fermentation system by Infors HT" med en volym på 0,5 l. Odlingen skedde vid 30 °C och med ett pH som varierade mellan 4,6 och 3,4. Näringstillägg skedde med glukos och efter 48 timmar inducerades odlingen av metanol. Då glycerol användes som näringsskälla gavs en ökad mängd biomassa men minskat produktutbyte (Wetzel *et al.* 2016).

Beroende på vilken näringstillägg som används varierar även tillväxthastigheten. Vid en studie var cellernas dubblingstid 4,5 timmar vid tillsats av metanol och 1 timme vid tillsats av glukos (van Zutphen *et al.* 2010).

4.3.3.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem

Vanliga stammar och promotorer som används av och för *H. polymorpha*

Tre vanliga stammar är CBS4372, NCYC495 och DL-1. Alla dessa stammars genomsekvenser finns tillgängliga. De populäraste promotorerna är P_{MOX} , P_{DHAS} och P_{FMD} . Den förstnämnda promotorn, P_{MOX} , har resulterat i ett av de högsta utbytena för glukoamylas (1,4 g/l) samt fytas (13,5 g/l). För denna promotor används metanol som inducerare (Adivitiya *et al.* 2017). Inom biotekniken är det oftast stammarna CBS4372 och DL-1 som används (Stasyk 2017).

Optimala odlingsförhållanden

Vid rekombinant proteinframställning av streptavidin testades två olika odlings temperaturer, 30 °C och 37 °C. Det visade sig att odling vid 30 °C gav mellan 1,2 och 1,9 gånger större produktutbyte. Ett skiftande pH-värde mellan 4,6 och 3,4 gav också ett högre produktutbyte i jämförelse med ett konstant pH-värde på 4,6 (Wetzel *et al.* 2016).

H. polymorpha kan kontrolleras på ett effektivt sätt genom att använda glycerol istället för metanol vilket kan göra den till ett bättre alternativ för storskaliga fermenteringsprocesser (Mack *et al.* 2009).

4.3.3.3 Utbyte och renhetsgrad

Uttryck av ett protein i *H. polymorpha*, *P. pastoris* och *E. coli* för jämförelse dem emellan

H. polymorpha kan nå en hög celldensitet och effektivt utsöndra proteiner med en molekylvikt på upp till 150 kDa (Çelik & Çalık 2012). Vid en studie uttrycktes ett rotavirus VP6-protein i tre olika värdorganismer för jämförelse. Det visade sig att uttryck av proteinet i kontrollerad miljö såsom en fermentor gav en ökad aktivitet för alla system; *E. coli*, *P. pastoris* och *H. polymorpha*, i jämförelse med odling i skakflaskor. Dock sjönk den specifika aktiviteten för *E. coli* och *P. pastoris* men inte för *H. polymorpha* (Bredell *et al.* 2016).

Vid odling i skakflaskor gav *P. pastoris* bättre resultat än både *H. polymorpha* och *E. coli* men vid odling i fermentorer gav *H. polymorpha* ett bättre resultat. Under odling i fermentorer gav *H. polymorpha* ett högre utbyte, cirka 3350 mg/l, i jämförelse med *P. pastoris* som gav ett utbyte på cirka 1430 mg/l samt *E. coli* som gav ett utbyte på cirka 469 mg/l. Däremot gav *P. pastoris* ett högre värde på biomassa (cirka 150 g/l) i jämförelse med *H. polymorpha* (cirka 90 g/l) och *E. coli* (cirka 27 g/l) (Bredell *et al.* 2016).

Uttryck av däggdjursproteiner i *H. polymorpha* och *P. pastoris*

Två modell-däggdjursproteiner, ett NK1-fragment på 22 kDa av humant hepatocyt-tillväxtfaktor och en extracellulär domän på 28 kDa av musvävnadsfaktor (MTF), uttrycktes för jämförelse mellan *H. polymorpha* och *P. pastoris*. Med *P. pastoris* som expressionssystem gavs ett utbyte på 5,7 mg/l av NK1-proteinet och i *H. polymorpha* 1,6 mg/l. Vid uttryck av MTF-proteinet gavs ett utbyte på 1,2 mg/l för *P. pastoris* och under 0,2 mg/l för *H. polymorpha* (Mack *et al.* 2009).

4.3.3.4 Exempel på uttryckta proteiner och kommersiell tillgänglighet

Peroxisomer som underlättar uttryck av instabila och känsliga proteiner

När metylotröfa jäster, såsom *H. polymorpha*, odlas på metanol bildas membranbundna organeller som kallas för peroxisomer. Då metanol är den enda kolkällan som används ockuperar peroxisomerna upp till 80 % av cellernas volym (Smith *et al.* 2012). Att proteiner samlas upp i peroxisomen är bra om proteiner som är toxiska mot jästen önskas uttryckas. Detta eftersom proteinerna då är skyddade av membranet hos peroxisomen.

En annan fördel med peroxisomerna är frånvaron av enzymer som kan modifiera de uttryckta proteinerna på oönskad vis, exempelvis genom oönskad glykosylering. Det är dessutom bra vid uttryck av proteiner som är instabila och känsliga mot proteolytisk nedbrytning i och med att de är skyddade från proteolys i matrixen hos peroxisomen (Nel *et al.* 2009). Ett exempel på en gen som uttryckts cytosoliskt på ett lyckat sätt i *H. polymorpha* under metanolinduktion är humant papillomavirus typ 16 (ChiΔH-L2) (Smith *et al.* 2012).

Exempel på proteiner som har uttryckts rekombinant i *H. polymorpha*

Produkter som har uttryckts i *H. polymorpha* och nått marknaden är exempelvis insulin, hepatit B vaccin och interferon alpha-2. Exempel på andra proteiner som har uttryckts rekombinant i jästen är glukosoxidas, fytas, glykolatoxidas, isopenicillin-N syntas och humant serumalbumin (Stasyk 2017). År 2013 blev uttryck av hepatit B vaccin i *H. polymorpha* tillåtet i Europa (Adivitiya *et al.* 2017). Även två modell-däggdjursproteiner har uttryckts i *H. polymorpha*. Dessa var det 22 kDa stora NK1-fragmentet av humant hepatocyt-tillväxtfaktor och det 28 kDa stora extracellulär domän från musvävnadsfaktor (MTF).

H. polymorpha kan utföra posttranslationella modifieringar, såsom glykosylering, vilket är till fördel då aktiva och lösliga däggdjursproteiner önskas uttryckas (Mack *et al.* 2009). För att se fler listade proteiner som har uttryckts i *H. polymorpha*, se tabell 11.

Tabell 11: Exempel på uttryckta proteiner i *H. polymorpha* med tillhörande utbyte om tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Fytas	13,5 g/l	Adivitiya <i>et al.</i> 2017
Glykoamylas	1,4 g/l	Adivitiya <i>et al.</i> 2017
Humant serumalbumin	Ingen data	Stasyk 2017
Rotavirus VP6	3,35 g/l	Bredell <i>et al.</i> 2016
NK1-fragment av humant hepatocyt-tillväxtfaktor	1,6 mg/l	Mack <i>et al.</i> 2009
Extracellulär domän av musvävnadsfaktor (MTF)	< 0,2 mg/l	Mack <i>et al.</i> 2009

4.3.4 *Leishmania tarentolae* – en parasit i människans tjänst

Två morfologiskt skilda former av *Leishmania*

Leishmania är ett släkte eukaryota, encelliga (protozoa) parasiter som förekommer i två morfologiskt skilda former. Den första formen är den promastigota (extracellulära), som bland annat återfinns i magen hos sandflugan. Sandflugan har gjort *Leishmania* känd eftersom den via vektorburen smitta av *Leishmania* ger upphov till olika former av sjukdomen *Leishmaniasis* (Andrea-Anneliese *et al.* 2014). Den andra formen är den amastigota (intracellulära) som lever i makrofager hos däggdjur. Övergången från promastigot till amastigot sker efter att en promastigot som tagit sig in via infektion har fagocyterats. Detta innebär en process där däggdjurens fagocyter (immunceller) bildar en membranbunden inneslutning kring parasiten i cellen, kallad fagosom.

Alla typer av *Leishmania* är inte sjukdomsframkallande

Även om det är känt att omkring 20 av de totalt 30 kända extracellulära *Leishmania*-parasiterna kan ge upphov till olika typer av infektion hos människor, är inte alla patogena (Andrea-Anneliese *et al.* 2014). Ett exempel på en icke-patogen art är *L. tarentolae*, av subpopulationen *Sauroleishmania*, som påträffats hos den vitfläckade geckoödlan (Legastelois *et al.* 2016). *L. tarentolae* har biologisk skyddsnivå* 1, den lägsta möjliga, med avseende på att den inte är patogen för oss människor (Jones 2015).

Vacciner och posttranslationella modifieringar

L. tarentolae har väckt intresse, inte bara för dess potential till att producera virulens-reducerade vaccin (Lacombe *et al.* 2018), utan också för att den har visat sig väl lämpad för att uttrycka eukaryota proteiner. Detta med posttranslationella modifieringar som liknar dem hos högre eukaryoter såsom däggdjur i stor utsträckning. Ett exempel är produktion av antikroppar (Taheri *et al.* 2016, Jones 2015).

L. tarentolae i egenskap av expressionssystem

L. tarentolae anses som lättodlad med möjlighet till suspensionsbaserad odling samt att den har en relativt kort generationstid i förhållande till andra eukaryota expressionssystem där generationstiden ligger på omkring 5–6 timmar. Selektion görs oftast med hjälp av antibiotika och målproteinerna kan antingen utsöndras i mediet eller ske intracellulärt. Med avseende på dessa egenskaper placerar sig därför *L. tarentolae* i gränlandet mellan prokaryota och eukaryota organismer. *L. tarentolae* är dessutom ett bra komplement till de mer etablerade systemen *E. coli* och *P. pastoris* eftersom dessa, till skillnad från *L. tarentolae* tenderar att under- respektive överglykosylera proteiner som uttrycks. Samtidigt uttrycks inga endotoxiner, såsom lipopolysackarider, eftersom *Leishmania* saknar ett yttre membran (Taheri *et al.* 2016). *Leishmania* är särskilt bra på att uttrycka glykoproteiner, vilka normalt utgör över 10 % av den totala proteinmängden i cellen (Basile & Peticca 2009).

4.3.4.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

Optimala odlingsförhållanden

L. tarentolae kan odlas i cellsuspension med hjälp av fermentor, vilket möjliggör en hög celldensitet ($>10^8$ celler/ml). Odlingen sker oftast i en temperatur på 26 °C (Davoudi *et al.* 2011, Taheri *et al.* 2016, Legastelois *et al.* 2016) med en generationstid på 5–6 timmar (Taheri *et al.* 2016).

Stabila transformationer

Då stammar av *L. tarentolae* med promotorsystemet T7*-TR infekterats av bakteriofager bärandes linjära DNA-element, vilka i jämförelse med cirkulärt DNA lättare integreras i genomet, har dessa bestått under 90 generationer (omkring 2 månader). Detta utan större effekter på varken strukturen eller mängden protein som uttryckts (Kushnir *et al.* 2011).

Integrerat i kromosomen har ett oförändrat uttryck setts av grönfloureserande protein (GFP) på upp till 6 månader (Bolhassani *et al.* 2011). *Leishmania* kräver heller inte särskilt dyra odlingsmedia. Oftast används hjärt-hjärninfusion (*eng.* Brain Heart Infusion, BHI) (Andrea-Anneliese *et al.* 2014, Langer *et al.* 2017) men även andra typer av media, såsom M199, används (Bolhassani *et al.* 2011).

Två exempel på odlingsförhållanden

- Suspensionsbaserad odling med *Leishmania*-expressionssystem (LEXSY) i BHI-medium tillsammans med 5 µg/ml hemin och 1 % penicillin eller streptomycin (Andrea-Anneliese *et al.* 2014, Langer *et al.* 2017).
- Stammen *L. tarentolae* ATCC 30267 odlades i dess promastigota stadiet vid 26 °C i M199 medium tillsammans med 5 % FBS, 40 mM HEPES, 2 mM L-glutamin, 0,1 mM adenosin, 0,5 µg/ml hemin och 50 µg/ml gentamicin (Bolhassani *et al.* 2011).

4.3.4.2 Optimeringsmetoder och vektorsystem

Två metoder kännetecknar uttryck av protein i *Leishmania*. Den första är konstitutiv expression, där transformation sker genom att via elektroporering* integrera generna av intresse. Detta sker genom att sätta in en expressionsvektor i kromosomen och tillåta det artegna RNA I-polymeraset sköta transkriptionen. Den andra metoden är ett inducerbart system, där T7 RNA-polymeras drivs via att en tetracyclinrepressor används (Legastelois *et al.* 2016).

En genorganisation som inte kräver transkriptionsfaktorer

Kartläggning av genexpressionen hos *Leishmania* har visat på att proteinkodande gener är polycistroniskt organiserade, det vill säga att ett mRNA kan koda för flera olika protein. Denna organisation leder till att transkription initieras vid ändan av "switch"-regionerna i varje kromosom. Detta helt utan definierade RNA-polymeras II-promotorer eller andra typiska transkriptionsfaktorer (Davoudi *et al.* 2011).

L. tarentolae saknar naturliga transportvägar

Det har upptäckts att utsöndringsvägarna för den här typen av parasiter (*trypanosomatida*) är väldigt lika de hos högre eukaryota organismer, såsom däggdjur (Davoudi *et al.* 2011). Det visade sig dock att *L. tarentolae* saknade flera av de gener som kodar för proteiner involverade i transporter, däribland $\beta 1/\beta 2$ -adaptiner, μ -adaptin samt ϵ -adaptin. Dessa är involverade i formationen av klatrin-associerade adaptorprotein (AP) komplex i jämförelse med andra medlemmar ur *Leishmania* (Raymond *et al.* 2012).

Dessa proteiner har en viktig roll när det kommer till reglering och formation av transportvesiklar för proteiner mellan golgiapparaten (golgiapparaten är något som saknas hos medlemmar av *Leishmania* *Sauroleishmania* till vilken *L. tarentolae* tillhör) (Carneiro 2016, Taheri *et al.* 2016), endosomer, lysosomer och plasmamembranet. Även kalciumberoende kopiner och Ras-liknande GTP-bindande proteiner, involverade i cellsignalering och membrantransport, saknas (Raymond *et al.* 2012).

Inkorporering av nya transportvägar kan lösa problemen med utsöndring

I *L. tarentolae* har detta lösts genom att bland annat använda signalpeptiden LMSAP (*eng. Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase) från *L. mexicana* (Kianmehr *et al.* 2016, Klatt & Konthur 2012). Det finns också kommersiellt optimerade system där transportvägar från andra medlemmar ur *Leishmania* har använts.

Ett sådant system är så kallat *Leishmania*-expressionssystem (LEXSY) från Jena Bioscience. Systemet har bland annat använts för stabil GFP-produktion med högt utbyte i olika typer av *Leishmania*, däribland *L. tarentolae*, *L. major* och *L. infantum*. Expressionsvektorn pLEXSY-EGFP har då den använts för konstitutivt uttryck av GFP bibehållet den fluorescerande aktiviteten efter 6 månader, även i frånvaro av antibiotika som G418 (Bolhassani *et al.* 2011).

LEXSY har använts för att uttrycka diverse proteiner, både intracellulärt och för transport ut till mediet. Genom utsöndring med hjälp av LEXSY-systemet har bland annat den mänskliga subenheten till histokompatibilitetskomplex II (MHC II- β) på 30 kDa lyckats uttryckas, med ett utbyte av 500 mg/l (*Jena Bioscience*, LEXSY-Eukaryotic Protein Expression).

Kodonoptimering och duplicering av gener

Kodonoptimering* har testats i *L. tarentolae*, med hjälp av systemet T7-TR, för att framställa darbepoetin alfa. Detta är en hyperglykosylerad analog till den mänskliga tillväxtfaktorn erytropoietin (EPO) på 40 kDa. Resultatet var en ökning från 0,50 till 0,99 utifrån kodonadaptationsindex (CAI), där GC-innehållet* ökade från 56 % till 58 %. Det bekräftades också att aktiviteten var jämförbar med motsvarande produkt uttryckt i äggstocksceller från kinesisk hamster (CHO-celler*) (Kianmehr *et al.* 2016, Langer *et al.* 2017). Proteinet utsöndrades i mediet, med hjälp av T7-promotorn och signalpeptiden LMSAP från *L. mexicana*, genom att inducera 10 $\mu\text{g/ml}$ tetracyklin. För att göra detta användes vektorerna pLEXSY_I-blecherry3 och pLEXSYDarbo (Kianmehr *et al.* 2016).

Ett annat sätt att öka uttrycket är att öka det kvantitativa antalet av den gen som önskas uttryckas. Detta har gjorts genom att transformera in ytterligare en expressionsvektor. Det

medförde att antalet kopior av genen ökade, vilket i sin tur resulterade i ett högre utbyte (Davoudi *et al.* 2011).

Sju vektorer som använts för uttryck

Följande är exempel på sju vektorer som använts för uttryck i *L. tarentolae*:

- pLTEX-1-6 (Klatt & Konthur 2012)
- pLTEX-2_scFv-1 (Klatt & Konthur 2012)
- pLEXSY_sat2 (Klatt 2013)
- pLEXSY_hyg2 (Klatt 2013)
- LEXSY_I-blecherry3 (Kianmehr *et al.* 2016)
- pLEXSYDarbo (Kianmehr *et al.* 2016)
- pLEXSY-EGFP (Bolhassani *et al.* 2011)

4.3.4.3 Utbyte och renhetsgrad

L. tarentolae har en låg utsöndringsnivå av endogena proteiner eftersom organismen har tappat dessa egenskaper (Raymond *et al.* 2012). Detta underlättar sannolikt reningen och gör *L. tarentolae* lämpad för expression och utsöndring av rekombinanta proteiner, då dessa utgör majoriteten av den totala proteinmängden i mediet. Utsöndringen kräver dock integrering av utsöndringsvägar, såsom LSMAP från *L. mexicana*.

För rekombinanta proteiner ligger utbytet ofta omkring 0,1–30 mg/l (Taheri *et al.* 2016), även om utbyte på 300 mg/l har uppnåtts för GFP (Kushnir *et al.* 2011).

Här kan vidareutveckling av kodonoptimering eller utökning av antalet gener, via insättning av fler expressionsvektorer vara en möjlighet för att få ett ännu högre uttryck. Vad gäller utsöndring finns det potentiellt fler signalsystem som kan användas i *L. tarentolae*, härstammande från någon av de andra populationerna i *Leishmania*-familjen.

4.3.4.4 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

Flera varianter av *L. tarentolae* finns beskrivna, däribland LEXSY som tillhandahålls av Jena Bioscience (*Jena Bioscience*, LEXSY - Eukaryotic Protein Expression).

Rekombinant mänskligt interferon-gamma (rhIFN- γ) på 25 kDa har uttryckts framgångsrikt. Detta gjordes genom att motsvarande cDNA klonades in i två expressionsvektorer, som sedan kunde integreras in till den kromosomala 18S rRNA-genen hos *L. tarentolae*. De transformerade klonerna selekterades i närvaro av antibiotikat nourseotricin, varpå 9,5 mg/l rhIFN- γ (ungefär 0,8 % av det totala proteinet) kunde erhållas (Davoudi *et al.* 2011).

Ett annat exempel är membranproteinet ABCG6 som ingår i en typ av adenosintrifosfat-bindande (ABC) transportsystem. ABCG6 kommer i detta fallet från *L. braziliensis* men uttrycktes således i *L. tarentolae* med hjälp av vektorn pLEXSY. Men författarna hävdar att den metod som tagits fram skall möjliggöra uttrycket av vilket membranbundet protein som helst (Gonzalez-Lobato *et al.* 2016).

Exempel på uttryckta proteiner i *L. tarentolae* ses i tabell 12.

Tabell 12: I tabellen ses exempel på uttryckta proteiner i *L. tarentolae* med utbyte för vardera protein.

Protein	Utbyte	Referens
rRAGE, receptor	1,5 mg/l	Langer <i>et al.</i> 2017
hsGPVI	1,0 mg/l	Langer <i>et al.</i> 2017
Laminin-332	0,5 mg/l	Niimi 2016
sHeV G, G-protein	0,5 mg/l	Fischer <i>et al.</i> 2016
Pro-KLK2, Kallikrein-relaterat peptidas	0,9 mg/l	Skala <i>et al.</i> 2016
Mänskligt vimentin kopplat till antikroppsfragment från kanin (LOB7-rFc)	2,95 mg/l	Jørgensen <i>et al.</i> 2014
Murin laminin kopplat till antikroppsfragment från kanin (A10-rFc)	2,95 mg/l	Jørgensen <i>et al.</i> 2014
Grönt fluorescerande protein (EGFP)	300 mg/l	<i>Jena Bioscience</i> , LEXSY-Eukaryotic Protein Expression
Histokompatibilitetskomplex II- β (eng. major histocompatibility complex II β subunit, MHC II- β)	500 mg/l	<i>Jena Bioscience</i> , LEXSY-Eukaryotic Protein Expression
C-reaktivt protein (eng. human C-reactive protein, CRP)	44 mg/l	<i>Jena Bioscience</i> , LEXSY-Eukaryotic Protein Expression

4.3.5 *Physcomitrella patens* – mossan som är ett lovande alternativ till proteinproduktion i däggdjursceller

Mossan *Physcomitrella patens*, även kallad muddermossa, är en fotoautotrof* växt. Den har länge använts som modell för att studera tillväxt, utveckling och celldifferentiering hos växter generellt. På grund av dess förmåga att effektivt utföra homolog rekombination, är *P. patens* en av de mest använda växtexpressionssystemen för rekombinant proteinproduktion (Liénard & Nogué 2009). Denna unika förmåga, som inte finns hos andra växter, har fått mossan att kallas "grön jäst" (Decker & Reski 2008).

P. patens använder sig av transkription, translation och utsöndring på liknande sätt som däggdjursceller (Orellana-Escobedo *et al.* 2015). Precis som högre eukaryoter utför också *P. patens* posttranslationella modifieringar, såsom glykosylering och bildandet av disulfidbryggor. En annan fördel är att mossan odlas i miljöer fria från däggdjursvirus, bakterietoxiner och andra patogener. För produktion av terapeutiska proteiner är *P. patens* ett lovande alternativ till däggdjursceller (Liénard & Nogué 2009).

En dominerande haploid fas gynnar proteinproduktionen

Den haploida (enkel kromosomuppsättning) och diploida (dubbel kromosomuppsättning) fasen utgör *P. patens* livscykel. Under kontrollerade ljus- och temperaturförhållanden i minerallösning tar det omkring 10–12 veckor för *P. patens* att genomgå hela utvecklingscykeln *in vitro*. Den kan hållas i sin haploida fas under en längre tid, såväl i lösning som i fast medium (Liénard & Nogué 2009).

P. patens har många egenskaper som gör den till ett etablerat system för produktion av rekombinanta proteiner. Dess livscykel domineras av gametofyten, fasen då mossan är haploid. Den består då till största del av protonema, en filamentös vävnad där cellerna trådlikt växer fram ur sporer, som utnyttjas för proteinproduktion. Denna fas upprätthålls genom att mossan i cellsuspension löses upp med jämna mellanrum (Decker *et al.* 2015).

4.3.5.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

P. patens kan enkelt odlas under kontrollerade förhållanden i fotofermentorer (fermentorer med ljusstillsförel) som cellsuspension (Liénard & Nogué 2009) i endast mineralmedium. Ingen tillsats av antibiotika eller organiska kolkällor krävs (Reski *et al.* 2015), utan som enda kolkälla ges luftburen koldioxid (Decker & Reski 2008). Mossan kan odlas i fermentorer under god tillverkningssed (*eng.* Good Manufacturing Practice, GMP) upp till 500 liter för produktion av farmaceutiska produkter (Orellana-Escobedo *et al.* 2015).

Standardtemperaturen för odling av *P. patens* brukar ligga runt 22 °C och ljusperioden runt 16 timmar ljus respektive 8 timmar mörker, med ljusintensiteten 50–70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Decker *et al.* 2015). Ett så kallat Knop-medium har använts för att odla *P. patens* i cirka 20–25 °C (Hiss

et al. 2014). Transfektionen av *P. patens* protoplaster är ofta polyetylenglykol- (PEG-) baserad* (Decker et al. 2015), vilket gör att vilken typ av vektor som helst kan användas för transformation (Liénard & Nogué 2009).

4.3.5.2 Optimeringsmetoder

Signalpeptider kan användas för att utsöndra proteiner ut i odlingsmediet. Eftersom odlingsmediet för *P. patens* endast består av vatten och mineraler, är det enkelt och kostnadseffektivt att rena fram proteinet därifrån. Olika promotorer kan också användas för att höja nivåerna av uttryckt protein (Liénard & Nogué 2009). Bakteriepromotorer, endogena promotorer och fröväxtpromotorer har alla utvärderats för uttryck av transgener* i *P. patens*. *P. patens* accepterar många komponenter för genuttryck som utvecklades och optimerades för uttryck i äggstocksceller från kinesisk hamster (CHO-celler). Även endogena signalsekvenser används för att föra rekombinanta proteiner till endoplasmatiskt retikulum (ER) och sedan utsöndra dessa i odlingsmediet (Reski et al. 2015).

Optimering för att ändra glykosyleringsmönster

De flesta rekombinant framställda biofarmaceutiska proteiner är komplexa mänskliga glykoproteiner. Av den anledningen är utgångsläget för uttryck av dessa proteiner ofta däggdjursceller, främst CHO-celler*. Uttryck av komplexa glykoproteiner i växter kan vara ett alternativ eftersom växter har enkla odlingsförhållanden, billig produktion och inte hotas att infekteras av patogener farliga för patienten (Reski et al. 2015). *P. patens* glykosylerar proteiner genom att glykoepitoper, såsom α 1,3-fukos och β 1,2-xylos, sätts på de proteiner som uttrycks i mossan. Dessa epitoper hittas inte på mänskliga proteiner (Liénard & Nogué 2009).

Glykosyleringsmönstret för proteiner som uttrycks i *P. patens* har hos vissa cellinjer förändrats genom heterologt uttryck av glykosyltransferasgener, eller genom att slå ut dessa (Orellana-Escobedo et al. 2015). För att efterlikna glykosyleringsmönstret hos det mänskliga proteinet erytropoietin slogs gener som påverkar glykosylering hos *P. patens* ut. Detta gjorde att *P. patens*-stammen saknade de enzym som adderar α 1,3-fukos eller β 1,2-xylos. Därför kunde det mänskliga proteinet uttryckas rekombinant med korrekt glykosylering (Liénard & Nogué 2009).

Efter att *P. patens* genom blev sekvenserat år 2007, kunde data påvisa att kodonoptimering* i *P. patens* inte var nödvändig för uttryck av mänskliga gener. Detta är något som behövs i andra expressionssystem, såsom alger (Decker & Reski 2008).

4.3.5.3 Kommersiell tillgänglighet och exempel på uttryckta proteiner

P. patens används idag kommersiellt av företaget "Greenovation Biotech" för utveckling av biofarmaceutiska produkter (Moustafa *et al.* 2016).

Ett multiepitopprotein från HIV-virus har framgångsrikt uttryckts i *P. patens*, detta framkallade en immunrespons i mus. Proteinet kallades poly-HIV och utbytet var 3,7 µg/g i protonema-kulturer (Orellana-Escobedo *et al.* 2015).

För exempel på proteiner uttryckta i *P. patens* se tabell 13.

Tabell 13. Exempel på uttryckta proteiner i *P. patens* med utbyte för de proteiner där data finns tillgängligt.

Protein	Utbyte	Referens
Humant Alfa-galaktosidas A (Moss-aGal)	Ingen data	Loh <i>et al.</i> 2017
Multiepitopprotein från HIV (poly-HIV)	3,7 µg/g	Orellana-Escobedo <i>et al.</i> 2015
Humant erythropoietin (EPO)	0,5 mg/l	Weise <i>et al.</i> 2007

4.3.6 Suspensionsbaserad växtcellsodling – växtcellerna som kan odlas i fermentorer utan solljus

Under det senaste decenniet har växter blivit ett alltmer attraktivt system för produktion av rekombinanta proteiner. Växter är eukaryota organismer och har ett utvecklat system för posttranslationella modifieringar, med exempelvis liknande glykosyleringsmönster som däggdjursceller, och förmågan att producera stora proteiner med flera subenheter. Detta gör dem bättre anpassade till att uttrycka heterologa proteiner från högre organismer, än exempelvis prokaryota system. En annan fördel med växter är att odlingarna är mindre känsliga mot kontaminering jämfört med till exempel däggdjursceller som kräver en steril miljö (Santos *et al.* 2016).

Växtceller möter kraven för god tillverkningssed

Växter kan användas för proteinproduktion på olika sätt – antingen som hela växter eller i suspensionsbaserad odling av enskilda växtprotoplaster (växtceller utan cellvägg). Den suspensionsbaserade odlingen har många fördelar, exempelvis att odlingen sker i kontrollerade fermentorer. Detta innebär att processen direkt kan användas enligt god tillverkningssed (*eng.* Good Manufacturing Practice, GMP), till skillnad från transgena* växter som odlas fritt i växthus (Fischer *et al.* 2012).

Från tobak till morötter – alla kan användas

Växtceller odlade i suspension kan komma från alla typer av växter och växtdelar. Några av de vanligaste växterna inom forskning och industri är tobaksplantan (*Nicotiana tabacum*), ris (*Oryza sativa*), morot (*Daucus carota*) och ärtväxten tornlusern (*Medicago truncatula*) (Santos *et al.* 2016).

4.3.6.1 Odlingsförhållanden och utrustningsbehov

Transformation sker oftast via *Agrobacterium tumefaciens*

För att kunna föra in nytt DNA i en växtcell används ofta jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* vektorsystem. Denna infekterar cellerna och de nya generna integreras till genomet. Andra möjliga transformationsmetoder är elektroporering* eller så kallad mikroprojektilbombardering (se detaljer i avsnitt 5.3.2.2) (Huang & McDonald 2012).

Växtcellerna odlas i fermentorer och kräver inte ljus

Växtcellkulturer odlas i flytande medium i fermentorer. Till skillnad från hela växter, som kräver solenergi i odlingen, använder de enskilda växtprotoplasterna energi från kolhydratbaserade odlingsmedier. Detta innebär att cellerna inte behöver odlas i fotofermentorer (fermentorer med ljusstillsförel). Odlingsmedierna innehåller generellt sett en kolkälla såsom sackaros samt vitaminer, oorganiska salter och växthormoner. Det finns många olika varianter kommersiellt tillgängliga som passar olika sammanhang. Många av dessa baseras på det klassiska Murashige- och Skoogmediet (MS-mediet) (Santos *et al.* 2016).

Utbudet av fermentorer är i ständig utveckling och många modeller kan användas för odling av växtprotoplast. Rätt val av fermentormodell är viktig för uppskalning av produktionsprocessen. Fermentorererna måste erbjuda optimala förhållanden för en rad olika parametrar, däribland temperatur, syresättning, pH och förändring av cellmorfologi under odlingen. Cellmorfologin är en viktig parameter då cellerna ofta är runda i början och sedan blir mer avlånga, vilket påverkar hur homogen omrörningen i fermentorn blir. Växtceller växer och induceras i temperaturer mellan 20 och 28 °C där pH-värdet bör vara mellan 5,0 och 5,9. Gradienter i temperatur och pH kan bildas när cellerna ändrar morfologi vilket kan påverka produktionen av proteiner.

Ett exempel på fermentormodell som kan användas är omrörningsfermentor (*eng.* stirred-tank bioreactor) som erbjuder en homogen miljö, men är ganska dyra. Ett annat exempel är luftomrörningsfermentor (*eng.* air-lift bioreactor) som är billigare och gör mindre skada på cellerna, men som är sämre på att skapa en homogen miljö (Huang & McDonald 2012). "Belach Bioteknik" säljer båda dessa modeller av fermentorer, till exempel modellen "Lars" som är en omrörningsfermentor.

Växtceller är snabbare än däggdjursceller, men långsammare än prokaryoter

Odlingstiden för växtceller är generellt sett snabbare än för däggdjursceller och hela växter, men långsammare än för prokaryoter. En av de vanligaste cellinjerna av tobaksplantan *N. tabacum* heter Bright Yellow 2 (BY-2) och den har en generationstid på 16–24 timmar och en kultur kan växa sig 100 gånger större på 7 dagar. Risceller har en generationstid på 36–40 timmar (Santos *et al.* 2016). En mer tidskrävande process är dock framställningen av cellkulturerna och att undersöka vilken kultur som är mest aktiv. I en studie om rekombinant produktion av ett protein i risceller beskrivs processen, där den totala tiden att gå från vanliga risfrön till en transformerad cellkultur med effektivt uttryck tar 7 veckor. När en bra riscellkultur identifierats kan den användas för produktion (Nam *et al.* 2017).

4.3.6.2 Optimering – framtiden kräver högre utbyten

Jämfört med prokaryota system, som exempelvis *E. coli*, är växtceller relativt nya expressionssystem. På grund av detta har inte lika stora framsteg gjorts i optimeringsprocesser för att maximera systemens utbyte. Optimeringsarbete sker bland annat i utvecklingen av vektorsystem, fermentordesign, induktionsmetoder, sammansättning av odlingsmedia, kodonoptimering* samt motverkning av att målproteinet degraderas i cellerna eller mediet (Santos *et al.* 2016).

Mycket arbete har lagts på optimering av glykosyleringsmönster

Glykosyleringsmönstret i växter och däggdjursceller är identiska i början av veckningsprocessen, men när proteinet transporteras till golgiapparaten uppkommer små skillnader i sockerstrukturerna. Befarandet att dessa skulle vara skadliga i läkemedel för människor gjorde att utvecklingen av mer humanlika glykosyleringsmönster tog fart. Dock har brist på bevis för skadlighet lett till minskat arbete inom detta område. Ett glykosyleringsmönster som inte är anpassat för värdcellen kan däremot ge ett lägre utbyte. Om växtspecifika glykosyleringsmönster såldedes vill undvikas, kan produktionen av rekombinanta proteiner riktas till endoplasmiskt retikulum (ER) i cellen. Detta gör att proteinet bibehåller den generiska glykosyleringen som är identisk för däggdjurs- och växtproteiner (Santos *et al.* 2016).

4.3.6.3 Vektorsystem

Transformation via *Agrobacterium* kräver två vektorer

Eftersom transformationen av växtceller oftast sker via infektion av *A. tumefaciens* är vektorsystemen som används baserade på den virulenta plasmiden från denna bakterie. För att få en effektiv genöverföring har ett binärt vektorsystem utvecklats. Det innebär att två olika plasmider används för överföring. Den ena plasmiden innehåller genen, eller generna, som ska integreras i genomet och kallas för den binära vektorn. Den andra plasmiden, hjälparvektorn (*eng.* helper plasmid) eller Ti-plasmiden, innehåller virulensgenerna som möjliggör genöverföring och integrering till växtgenomet. Den binära vektorn kan konstrueras i andra enklare system såsom *E. coli* och sedan transformeras in i en *A. tumefaciens*-stam

tillsammans med en lämplig hjälparvektor. Exempel på binära vektorer och hjälparvektorer listas nedan (Huang & McDonald 2009).

- pGreen – selektionsmarkörerna är resistens mot antibiotika kanamycin och hygromycin, sulfonylurea och fosfotricin. Måste användas tillsammans med hjälparvektorn pSoup för uttryck.
- pPZP200 – selektionsmarkörerna är resistens mot kanamycin och gentamicin.
- pCambia – selektionsmarkörerna är resistens mot kanamycin, hygromycin och Bar.

Till skillnad från den binära vektorn, som designas för att innehålla den intressanta genen, har hjälparvektorn ingen unik funktion för varje nytt experiment. Detta beror på att dess funktion är att hjälpa till att integrera generna från den binära vektorn in i genomet. Av denna anledning är olika stammar av *Agrobacterium* transformerade med olika hjälparvektorer och stam väljs således utifrån vilken hjälparvektor som önskas. I tabell 14 listas några exempel (Lee & Gelvin 2008).

Tabell 14: Vanligt förekommande stammar av *A. tumefaciens* och tillhörande hjälparvektor. Samtliga selektionsmarkörer är baserade på resistens mot olika antibiotika.

Stam	Hjälparvektor / Ti-plasmid	Selektionsmarkör	Referens
AGL-1	pTiBo542	Rifampicin, karbenicillin	Lazo <i>et al.</i> 1991
EHA105	pTiBo542	Rifampicin	Hood <i>et al.</i> 1993
C58-Z707	pTiC58	Kanamycin	Hepburn <i>et al.</i> 1985
NT1(pKPSF2)	pTiChry5	Erytromycin	Palanichelvam <i>et al.</i> 2000

Promotorer och signalpeptider

Några vanliga promotorer för uttryck i växtceller är CaMV35S, som är en stark konstitutiv promotor, och *alcA*, som är inducerbar med etanol (Habibi *et al.* 2017). En vanligt förekommande promotor för rissceller är *Ramy3D* som aktiverar genuttryck när glukos inte finns tillgängligt i miljön (Toyofuku Kyoko *et al.* 1998). Samuttryck av signalpeptider, som möjliggör utsöndring av proteinet ut i odlingsmediet, kan användas tillsammans med promotorn. I en studie jämfördes effektiviteten och erhållet utbyte för tre olika signalpeptider, där 33KDsp visade sig vara bäst för utsöndring av rekombinanta proteiner (Huang *et al.* 2015). En version av samma promotor, α my8, har bland annat använts för att uttrycka allergenet Der p 2 (Su *et al.* 2012).

4.3.6.4 Exempel på uttryckta proteiner och utbyte

Den stora nackdelen med växtcellbaserad produktion är att utbytet av rekombinanta proteiner ännu inte når upp till de höga nivåer som kan fås av vissa prokaryoter eller däggdjursceller (Santos *et al.* 2016). I tabell 15 sammanställs ett antal olika proteiner som har uttryckts rekombinant i växtceller och hur stort utbytet blev.

Tabell 15: Exempel på uttryckta proteiner och utbyten i celler från tobaksplanta respektive risceller.

Organism	Protein	Utbyte	Referens
<i>N. tabacum</i> (BY-2)	Hepatit B-antikropp (α -HBsAg)	15 mg/l	Sunil Kumar <i>et al.</i> 2007
<i>N. tabacum</i> (BY-2)	2G12 monoklonal α -HIV, antikropp	12 mg/l	Holland <i>et al.</i> 2010
<i>N. tabacum</i> (BY-2)	Humant tillväxthormon (HGH)	35 mg/l	Xu <i>et al.</i> 2010
<i>O. sativa</i>	Humant α 1-antitrypsin	100–247 mg/l	McDonald <i>et al.</i> 2005
<i>O. sativa</i>	hCTLA4Ig, immunosuppressor	31,4 mg/l	Lee <i>et al.</i> 2007
<i>O. sativa</i>	Der p 2-FIP-fve, allergen fuserat med immunmodulator	10,5 % TSP*	Su <i>et al.</i> 2012
<i>O. sativa</i>	Humant tillväxthormon (HGH)	120 mg/l	Kim <i>et al.</i> 2008a

4.3.6.5 Kommersiell tillgänglighet och kostnad

Det första läkemedlet som producerades rekombinant i växter är Eleyso, även kallat taligluceras alfa, och producerades av "Protalix Biotherapeutics" i suspensionsodlade morotsceller (Santos *et al.* 2016). Läkemedlet godkändes av amerikanska livs- och läkemedelsverket (*eng.* Food and Drug Administration, FDA) år 2012 för användning i vuxna patienter. Morotscellerna är lanserade som ProCellEx™ och odlas i engångsfermentorer bestående av polyetylenpåsar (Protalix, ProCellEx Platform). Eleyso är i dagsläget det enda läkemedel på marknaden som har producerats i växtcellskulturer, men många nya läkemedel ingår just nu i kliniska tester för att kunna godkännas (Santos *et al.* 2016).

Celler från tobaksplantan för suspensionsbaserad odling finns listad i Thermo Fisher Scientifics databas för tillgängliga cellinjer (Thermo Fisher Scientific, Cell lines).

Den övergripande kostnaden för växtcellsbaserad proteinproduktion uppgavs år 2016 vara omkring 50–1000 amerikanska dollar per gram protein. Detta kan jämföras med odling av hela växter som är billigare (20–100 dollar/g) och däggdjursceller som är dyrast (1000–10 000 dollar/g) (Santos *et al.* 2016).

5. Diskussion

I denna rapport har tolv expressionssystem för rekombinant proteinproduktion presenterats. Dessa expressionssystem är alternativ till *E. coli* och *P. pastoris* för Thermo Fishers produktion av allergena proteiner. Sex av systemen är prokaryota och sex stycken är eukaryota. Alla system har sina för- och nackdelar och nedan ställs de mot varandra.

5.1 Prokaryoter vs. eukaryoter

Det finns många skillnader mellan prokaryoter och eukaryoter som expressionssystem. En gemensam faktor för alla system som presenterats här är dock att de kan odlas i flytande media i fermentorer, vilket möjliggör odling i Thermo Fishers lokaler. En stor fördel med prokaryoter är att de har en enklare och kortare odlingsprocess. Skillnaderna i odlingstid är dock mindre mellan encelliga eukaryoter, såsom *H. polymorpha* (van Zutphen *et al.* 2010), och prokaryoter (Maïke *et al.* 2015) än för växtbaserade expressionssystem (Santos *et al.* 2016). Framförallt är det förarbetet, att skapa ett stabilt och effektivt uttryck i eukaryoter, som är tidskrävande (Nam *et al.* 2017).

De verkligt höga utbytena har främst identifierats i prokaryota system, såsom *C. glutamicum* (An *et al.* 2013, Yim *et al.* 2014) och *P. fluorescens* (Jin *et al.* 2011, Retallack *et al.* 2012). Det kan dock delvis bero på att proteinerna som uttryckts var lättuttryckta, samtidigt som de proteiner som testas i eukaryota system ofta är proteiner som har varit svåra att uttrycka i prokaryoter. Jämförelserna i utbyte mellan organismgrupperna är därför svåra att göra rättvisa. En annan faktor till högre utbyten i prokaryoter kan vara att dessa system har funnits längre än exempelvis växtsystem och därför har kommit längre i optimering för maximalt utbyte.

En av de stora flaskhalsarna vid uttryck av komplexa proteiner är värdcellens förmåga att utföra posttranslationella modifieringar. Här är eukaryota organismer fördelaktiga då de har mer utvecklade maskinerier för proteinveckning och addition av molekyler såsom kolhydrater och lipider. Eftersom många allergener härstammar från eukaryota organismer, kan eukaryota expressionssystem resoneras vara bättre lämpade för detta. Prokaryoter saknar dock inte helt förmågan att utföra posttranslationella modifieringar och alla allergener är inte beroende av dessa, vilket gör att prokaryota system inte ska uteslutas.

5.2 De prokaryota systemen

Fördelar med de grampositiva bakterierna – utsöndring och inga endotoxiner

Utav de prokaryota expressionssystemen som har utvärderats i denna rapport är tre stycken grampositiva och tre stycken gramnegativa bakterier. Det finns en del större skillnader mellan dessa. Bland annat har de grampositiva bakterierna enbart en cellvägg, vilket underlättar utsöndring av proteiner direkt ut till odlingsmediet (von Heijne 1990). Detta kan jämföras med gramnegativa bakterier som har två cellmembran och där proteinerna oftast fastnar i periplasman vid utsöndring (Song *et al.* 2017). Att de grampositiva bakterierna lättare utsöndrar proteiner är till fördel eftersom det underlättar reningen och kan ge högre utbyten. Dessutom producerar de grampositiva bakterierna inte några endotoxiner (Liu *et al.* 2016, Song *et al.* 2017) vilket de gramnegativa bakterierna gör i form av exempelvis lipopolysackarider som är en del av deras yttermembran (Taheri *et al.* 2016). Detta återfinns alltså inte hos de grampositiva bakterierna som helt saknar yttermembran. Utifrån dessa synpunkter kanske en grampositiv bakterie är att föredra framför en gramnegativ för rekombinant proteinframställning.

Inklusionskroppar – ett av de stora problemen

När det kommer till problemet med inklusionskroppar kan det inte dras någon slutsats om huruvida dessa förekommer mer sällan i de grampositiva än i de gramnegativa bakterierna. Dock tas problemet upp för den gramnegativa bakterien *P. fluorescens* (Huang *et al.* 2007), men inte lika mycket för de övriga. Exempelvis har både *L. lactis* och *R. eutropha*, som är en grampositiv respektive gramnegativ bakterie, uttryckt lösliga och aktiva proteiner som tidigare har bildat inklusionskroppar i *E. coli* (Barnard *et al.* 2004, Frelet-Barrand *et al.* 2010). Däremot kan *P. fluorescens* återlösa inklusionskroppar på ett effektivt sätt (Huang *et al.* 2007). Det innebär dock ett ytterligare steg i processen och bidrar till en både tidsmässig och ekonomisk aspekt.

Med *P. haloplanktis*, en gramnegativ bakterie, som expressionssystem har inga inklusionskroppar upptäckts vid uttryck av rekombinanta proteiner (Sannino *et al.* 2017). Denna bakterie är psykrotrof vilket innebär att den är köldtolerant och kan växa i väldigt låga temperaturer i jämförelse med andra bakterier (Parrilli & Tutino 2017). Med tanke på detta kan frånvaron av inklusionskroppar bero på den sänkta temperaturen som destabiliserar de interaktioner som förekommer i dem (Sannino *et al.* 2017). Att bakterien inte bildar inklusionskroppar lika mycket som en annan bakterie behöver alltså inte bero på att bakterien är gramnegativ. Det verkar med andra ord inte finnas något samband mellan bildandet av inklusionskroppar hos grampositiva eller gramnegativa bakterier.

Vilka sorters proteiner uttrycker de olika expressionssystemen?

I och med att olika proteiner är olika svåra att uttrycka kan det vara viktigt att se vilka slags proteiner de olika expressionssystem har uttryckt. Vi vet inte exakt vilka proteiner Thermo Fisher har problem med att uttrycka, eller vilka egenskaper dessa proteiner har. Därför är det

svårt för oss att avgöra vilka specifika exempel på proteiner som påvisar att ett expressionssystem är bra för just Thermo Fishers verksamhet.

L. lactis har med framgång använts för att uttrycka ett jordnötsallergen, Ara h 2 (Glenting *et al.* 2007), och ett kvalsterallergen, Der p 2 (Zhang & Ai 2016). Förutom dessa allergener har *L. lactis* uttryckt flera växtproteiner (Ferro *et al.* 2018), vilket kan vara till fördel eftersom många allergena proteiner härstammar från växter. *L. lactis* är också ett bra alternativ för uttryck av membranproteiner då flera eukaryota membranproteiner har uttryckts i denna bakterie i aktiv form (Ferro *et al.* 2018).

Uttrycker expressionssystemen tillräckligt stora mängder protein?

För att kunna använda organismer som expressionssystem bör de kunna uttrycka tillräckligt stora mängder av proteinet av intresse. Det är svårt att avgöra om det är någon bakterie som ger bättre utbyte än någon annan i och med att de uttrycker olika proteiner. Om en bakterie ger ett väldigt högt utbyte kan det bero på att bakterien är ett väldigt bra alternativ att använda som expressionssystem. Det kan också bero på att proteinet är väldigt enkelt att uttrycka och att väldigt många bakterier, exempelvis *E. coli*, skulle kunna uttrycka proteinet med samma, eller kanske till och med högre, utbyte. Utifrån vår utvärdering kan dock ses att *C. glutamicum* (An *et al.* 2013, Yim *et al.* 2014) och *P. fluorescens* (Jin *et al.* 2011, Retallack *et al.* 2012) generellt ger höga utbyten medan *L. lactis* oftast ger låga utbyten (Singh *et al.* 2018). *P. haloplanktis* ger väldigt varierande utbyten, från högt till lågt (Cusano *et al.* 2006, Ripa *et al.* 2012, Sannino *et al.* 2017). Det finns några specifika exempel där en del bakterier har uttryckt proteiner med ett högre utbyte än vad *E. coli* har gjort (Barnard *et al.* 2004, Huang *et al.* 2007, Cano-Garrido *et al.* 2014).

Hur etablerade är de olika systemen?

En annan aspekt som är viktig att ta hänsyn till är hur etablerade systemen är och hur många verktyg som finns tillgängliga för uttryck av proteiner. En del av de utvärderade systemen är mycket etablerade och har exempelvis många vektorsystem som kan användas vid uttryck av olika proteiner, medan det inte alls finns lika många alternativ för andra. Exempelvis är *C. glutamicum* en mycket etablerad bakterie som har använts i över 50 år (Maiké *et al.* 2015). För denna bakterie är odlingsegenskaper, genetik och biologiska processer väl studerade (Liu *et al.* 2016), vilket kan vara till stor hjälp då många olika sorters proteiner önskas uttryckas.

Även *L. lactis* är etablerad och har funnits på marknaden inom fermentering av mejeriprodukter en längre tid, men har på senare tid också etablerats inom biotekniken (Song *et al.* 2017). För denna bakterie finns det ett väl använt och relativt studerat vektorsystem, där olika optimeringsstudier har utförts (Cano-Garrido *et al.* 2014). Däremot är inte *P. haloplanktis* lika etablerad och välstuderad som någon av de andra bakterierna (Parrilli & Tutino 2017), vilket både kan vara till för- och nackdel. Expressionssystemet kanske kan vara lösningen till uttryck av komplexa proteiner, men det kanske också kan vara svårt nyttja det till sin fulla potential idag. *P. haloplanktis* genom är däremot studerat, vilket underlättar vid fortsatta studier och optimeringsarbeten kring denna bakterie som expressionssystem.

5.3 Eukaryota expressionssystem – bra på veckning men arbetar långsamt

De eukaryota expressionssystemen uppvisar en stor bredd i egenskaper, men har också många likheter. Den största gemensamma fördelen med dessa jämfört med prokaryota system är deras förmåga att utföra posttranslationella modifieringar. Den största gemensamma nackdelen är att det är svårare och tar längre tid att få fram transgena celler, dels på grund av att generna önskas inkorporeras kromosomalt och för att de växer långsammare jämfört med prokaryoter (Legastelois *et al.* 2016).

Mikroalger, mossa och växtceller – nära släktingar med skilda egenskaper

Till skillnad från däggdjursceller är växtbaserade system okänsliga mot kontaminering av virus som finns på människor (Santos *et al.* 2016), vilket gör dem bättre anpassade för produktionslokaler som inte är sterila. Trots det tillkommer vissa problem ändå vid odlingen.

Mikroalgen *C. reinhardtii* och mossan *P. patens* kräver båda två tillgång till ljus för proteinproduktion (Liénard & Nogué 2009, Dyo & Purton 2018), vilket skulle innebära att Thermo Fisher behöver utöka sin befintliga utrustning till fotofermentorer. *C. reinhardtii* är egentligen mixotrof och skulle alltså därför kunna odlas utan ljus i näringsmedium. Dock regleras alla promotorer som används idag av ljus och högst utbyte fås om produktionen riktas till kloroplasten istället för cellkärnan (Carrera Pacheco *et al.* 2018), vilket gör det oundvikligt att använda den utan ljusenergi i dagsläget. Att proteinuttrycket bör riktas till kloroplasten är unikt för *C. reinhardtii*, eftersom denna organism har större kloroplast än andra växter (Rosales-Mendoza *et al.* 2012). Kloroplastbaserad produktion innebär vissa nackdelar, däribland att det är svårt att få en effektiv genöverföring och att glykosylering inte är möjlig (Rosales-Mendoza *et al.* 2012, Shamriz & Ofoghi 2016).

Dessa problem finns inte i mossan *P. patens* där transgener kan inkorporeras i cellkärnan (Liénard & Nogué 2009). De har däggdjurslika glykosyleringsmönster och optimering har utförts för att kunna uttrycka proteiner med humant glykosyleringsmönster (Liénard & Nogué 2009, Reski *et al.* 2015). Utifrån dessa resonemang verkar *P. patens* vara ett mer attraktivt system än *C. reinhardtii*, men *C. reinhardtii* har använts för att uttrycka ett stort antal allergena proteiner med rätt veckning. Det ska dock tilläggas att båda dessa system ger mycket låga utbyten i dagsläget, men vidare optimeringsarbete kan komma att påverka detta i framtiden.

Enskilda växtceller som expressionssystem kan jämföras med tidigare nämnda mikroalg och mossa. En stor fördel med växtcellerna är att de kan odlas i näringsmedium och inte kräver ljusenergi (Santos *et al.* 2016), vilket gör dem direkt applicerbara till Thermo Fishers redan befintliga fermenteringsutrustning. Även växtcellerna är motståndskraftiga mot kontaminationer i labbmiljöer (Santos *et al.* 2016). Växtceller har visats ge högre proteinutbyten än *P. patens* och *C. reinhardtii* (McDonald *et al.* 2005), samtidigt som de har förmåga att utsöndra proteiner (Huang *et al.* 2015) och göra posttranslationella

modifieringar. Den övergripande proteinproduktionen i växtceller sades år 2016 vara billigare än för hela växter och för däggdjursceller (Santos *et al.* 2016).

Växtsystem kan vara bättre för Thermo Fisher än *H. polymorpha* och *L. tarentolae*

Vid jämförelse av växter med andra eukaryoter, *H. polymorpha* och *L. tarentolae* är den stora nackdelen med växterna att de odlas mycket långsammare (van Zutphen *et al.* 2010, Santos *et al.* 2016, Taheri *et al.* 2016) och att proteinutbytet är lägre (Lee *et al.* 2007, Bredell *et al.* 2016). Dessa nackdelar kan emellertid vägas upp med växternas direkta koppling till Thermo Fishers arbete, det vill säga att kunna producera allergener med rätt veckning. En stor del av alla allergener härstammar från växter, vilket skulle tala för att använda ett växtbaserat system för uttryck av just växtallergener. Detta på grund av att det är mer sannolikt att få ett korrekt veckat heterologt protein i en värdcell som är nära besläktad med organismen som proteinet härstammar från.

5.4 Eukaryoter med prokaryota egenskaper?

Två av de undersökta systemen tycks intressant nog placeras lite mittemellan pro- och eukaryota system i avseende på egenskaper. Dessa två är den grampositiva bakterien *S. lividans* och den encelliga eukaryoten *L. tarentolae*.

***L. tarentolae* saknar eukaryota organeller**

Eukaryota organismer innehåller normalt sett många organeller som saknas i prokaryoter. Ett exempel är golgiapparaten i eukaryoter, som är viktig för utsöndring av proteiner och de sista stegen i glykosyleringen av dessa. *L. tarentolae* saknar, liksom prokaryoter, denna organell vilket har varit problematiskt för att uttrycka exempelvis membranproteiner och glykoproteiner (Carneiro 2016). Detta kan dock tillhöra det förflutna eftersom optimeringsarbete hävdas möjliggöra uttryck av alla slags membranproteiner i *L. tarentolae*. Stammen LEXSY har arbetats fram för att kunna glykosylera och producera membranproteiner (Gonzalez-Lobato *et al.* 2016). En annan egenskap som gör *L. tarentolae* mer lik prokaryoter, förutom avsaknad av vissa organeller, är den kortare dubblingstiden på 5–6 timmar (Taheri *et al.* 2016). Denna tid kan jämföras med växter, vars dubbling generellt tar uppemot en dag (Santos *et al.* 2016). En kort dubblingstid hittas även hos jästsvampen *H. polymorpha*, som kan dubblas på 1–4,5 timmar (van Zutphen *et al.* 2010).

***Aspergillus* – ett bättre alternativ än *S. lividans*?**

S. lividans är prokaryot men visar stora morfologiska likheter med det eukaryota svampsläktet *Aspergillus*. Den stora likheten är att de båda bildar filament. Detta försvårar odlingsförhållandena i fermentorer då de tenderar att klumpas ihop, vilket kan leda till försämrat syre- och näringsupptag och därmed en ineffektiv produktion (Sevillano *et al.* 2016). En annan likhet är att de har naturliga utsöndringssystem (Su *et al.* 2012, Gabarró *et al.* 2017). Det är dokumenterat att *Aspergillus* har en ineffektiv utsöndring av heterologa proteiner jämfört med endogena proteiner (Su *et al.* 2012), medan något sådant påstående inte har hittats för *S. lividans*. Vid jämförelse av studier för heterologt uttryck i respektive

system är däremot skillnaderna i utbyte inte stora – båda systemen tenderar att producera mellan 50–100 mg/l protein (Punt *et al.* 2002, Noda *et al.* 2015). De två systemen kan alltså anses vara ganska lika i odlingsförhållanden och utbyte, men två stora skillnader finns. Den ena är att *S. lividans* har mycket lägre proteasaktivitet än *Aspergillus* (Kitamoto *et al.* 2015, Gabarró *et al.* 2017), vilket skulle tala för att *S. lividans* är ett bättre system. Den andra stora skillnaden, som möjligtvis är av större vikt, är *Aspergillus* förmåga att utföra eukaryota posttranslacionella modifieringar (Wiebe *et al.* 2001).

Hur ser framtiden för våra expressionssystem ut?

Det är svårt att säga hur framtiden kommer se ut och vilka expressionssystem som kommer att användas och inte. Idag är generellt de prokaryota systemen de mest studerade och använda. Detta innebär att de kommer närmare taket för hur bra de kan bli, medan de nyare systemen såsom suspensionsbaserade växtceller och andra eukaryoter inte är lika optimerade. Dessa kan dock utvecklas och optimeras vidare.

Däremot finns det bakterier som inte har undersökts som expressionssystem, eller som inte har studerats särskilt mycket. Ett exempel på detta är *P. haloplanktis* som anses vara lovande för rekombinant proteinproduktion, men som inte är särskilt etablerad idag. Genom fortsatta studier kring denna bakterie kanske många idag svåruttryckta proteiner kan uttryckas i framtiden.

I dagsläget är däggdjursceller såsom CHO-celler störst inom produktion av läkemedel, men växtcellkulturer är på framfart. Läkemedlet Eleryso[®] finns redan på marknaden och flera andra produkter genomgår kliniska tester för att kunna säljas inom en snar framtid. Andra menar emellertid att framtiden kommer domineras av så kallade cellfria system för uttryck av komplexa proteiner. Detta betyder att maskineriet för proteinsyntes och veckning isoleras och proteiner får syntetiseras *in vitro*. På så vis elimineras faktorer som ineffektiviserar utbytet i ett expressionssystem, såsom degradering via proteaser eller ineffektiv utsöndring (Carlson *et al.* 2012).

5.5 Slutsats – inget system är perfekt

Som tidigare nämnt är olika proteiner olika svåra att uttrycka. En del expressionssystem kan vara anpassade för att uttrycka ett visst protein medan andra system kan vara anpassade för att uttrycka ett annat. En organism kan uttrycka ett protein som är lösligt och aktivt, medan det bildas inklusionskroppar i en annan organism och vice versa. Detsamma gäller utbyte där en del expressionssystem kan uttrycka ett protein med tillräckligt högt utbyte, medan det uttrycker andra proteiner med låga utbyten. Slutsatsen kan dras att inget system är perfekt. Det finns inget som kan uttrycka alla proteiner med rätt modifieringar och med ett tillräckligt högt utbyte, men med den presenterade verktygslådan innehållandes expressionssystem som kompletterar varandra, kan alla svåruttryckta proteiner istället bli lättuttryckta.

6. Etisk analys

6.1 Proteinframställning och dess utveckling

När ordet protein för första gången myntades i text, år 1838 (Vickery 1950), trodde man att det endast var något som producerades av växter och tog sig in i djurlivet först när djuren åt av växterna. Arbetet gick framåt och år 1926 kristalliserades för första gången ett enzym. Enzymet var ureas och hade isolerades från en böna. Samtidigt visades det att enzymer var proteiner vilket kom att resultera i ett nobelpris år 1946 (Simoni *et al.* 2002, Balasubramanian & Ponnuraj 2010). År 1953 sekvenserades sedan det första proteinet, nämligen insulin (Stretton 2002). Utvecklingen har gått framåt och i skrivandets stund finns det 557 275 olika proteiner införda i databasen Swiss-prot hos Uniprot (www.uniprot.org). Idag har proteiner kommit att bli aktuellt för allehanda tillämpningar där de används i teurapeutiska syften såväl som i matproduktion och vid berikning av dessa.

Det finns idag två huvudsakliga metoder för att ta fram eller isolera proteiner av intresse. Den första metoden är att extrahera proteinet direkt från en råvara eller naturprodukt genom olika reningsprocesser. Den andra metoden är att låta celler, ofta mikroorganismer, rekombinant producera de proteiner vi är intresserade av. Detta har blivit en alltmer etablerad metod sedan olika former av DNA- och odlingstekniker tagits fram (Khan *et al.* 2016).

År 1997 tillät amerikanska livs- och läkemedelsverket (*eng.* Food and Drug Administration, FDA) fler läkemedel baserade på rekombinant teknik än någonsin tidigare, vilket har lett till att många läkemedel idag kommer från just rekombinant proteinframställning. Detta har i sin tur banat vägen för förmågan att behandla olika sjukdomstillstånd i stor utsträckning (Khan *et al.* 2016).

Utan dessa tekniker och utan möjligheten att uttrycka proteiner för framställning av vacciner, mediciner eller diagnostiska verktyg hade vi sannolikt haft en betydligt sämre livskvalitet idag. Dessutom erbjuder rekombinant proteinframställning inte bara en billigare och mindre tidskrävande process, utan också en säkrare och jämnare slutprodukt (Khan *et al.* 2016). Detta då tillgången till protein från naturlig källa, i motsats till rekombinant proteinframställning, oftast är säsongsberoende samt kan variera kraftigt i både kvantitet och kvalitet (Yada *et al.* 2013).

6.2 Traditionella metoder för proteinframställning väcker miljöetiska frågor

6.2.1 Rekombinant proteinframställning kan minska matsvinnet – ett konsekvensetiskt perspektiv

Produktion eller extraktion av önskade proteiner sker ibland på bekostnad av råvaror som annars skulle kunnat användas till matkonsumtion. Ett klassiskt exempel på detta är framställning av insulin i medicinskt syfte, som tidigare utvanns från grisar. Detta kan jämföras med dagens rekombinanta framställning i mikroorganismer, såsom *E. coli*, där ingen potentiell föda går till spillo (*Nationalencyklopedin*, insulin).

Samma sak gäller för Thermo Fishers framtagning av allergena proteiner, som traditionellt sett sker genom att mala ned exempelvis ätklara djur och växter till extrakt. Här krävs konsekvensetiska avvägningar mellan nyttan med extraktframställningen och den förlorade matresursen. Med denna problematik som bakgrund kan det hävdas att rekombinant proteinframställning i mikroorganismer är ett bättre alternativ, både med avseende på specifik isolering av önskat protein och minimering av förlorade matresurser. Detta även om vissa födoämnen som skulle kunnat användas av oss människor ingår i odlingsmedia till mikroorganismer. Detta kan anses försumbart i jämförelse.

6.2.2 Mikroorganismers och djurs egenvärde – ett pliktetiskt perspektiv

När man tänker på pliktetik och organismers egenvärde väcks istället frågan om vilken organism som lider mest? Är det de djur som används för att ta fram extrakt, eller de organismer som används vid rekombinant expression? Mikroorganismerna, i det här fallet bakterier och jäst, är fler till antalet men har samtidigt inget nervsystem som krävs för att exempelvis uppleva smärta. Återigen kan exemplet med insulinproduktion användas, där många grisars lidande ställs i proportion till många fler bakteriers eventuella lidande.

Samma jämförelse gäller givetvis för framtagandet av allergena proteiner till allergitester. Där kan exempelvis lidandet hos nermalda djur jämföras med eventuellt lidande hos de mikroorganismer som uttrycker samma allergena protein. När det kommer till att göra extrakt av djur används dock ofta produkter som annars ändå skulle säljas som mat, vilket skulle kunna anses mindre problematiskt pliktetiskt men som fortfarande blir en fråga rörande matresurser. Ett exempel på extraktion från naturprodukt är en av de vanligast förekommande allergener i fisk, parvalbumin (Rosmilah *et al.* 2013), som extraheras från muskelvävnad (Jiaju *et al.* 2017). Det skulle kunna hävdas att all användning av djur anses oacceptabelt ur ett pliktetiskt perspektiv. Gör man det så bör man även lyfta frågan om

djurförsök. Om djurförsök och användandet av extrakt från djur skulle vara fel, vare sig extraktet tas från mattillgångar eller inte, skulle det innebära att dagens sjukdomsbehandlingar inte alls hade varit tillgängliga i samma utsträckning. En del pliktetiker skulle kanske hävda att användningen av djur inte alls är ett problem. Detta eftersom djuren i sådana fall inte anses ha några rättigheter, eller ivartfall inte samma rättigheter som oss människor.

Som tidigare nämnts kan dessa eventuella problem oftast undvikas med rekombinant proteinframställning. Ett ställningstagande som dock kan tyckas mer komplicerat är då rekombinant framställning sker i högre eukaryoter, och då inte minst däggdjursceller.

6.3 Rekombinant proteinframställning i däggdjursceller – en fråga om egenvärden

Vid rekombinant proteinframställning av eukaryota proteiner eftersträvas en korrekt veckning och posttranslationella modifieringar, som ofta inte kan åstadkommas av prokaryota värdcellers maskineri. Av denna anledning används ibland däggdjursceller, som ofta bättre kan uppnå önskad kvalitet på de uttryckta proteinerna. Detta innebär att celler från däggdjur på ett eller annat sätt extraheras, modifieras och odlas. Här väcks återigen den pliktetiska frågan om djurens egenvärde och den konsekvensetiska frågan om nytta och onytta. Är det okej att en del däggdjur går åt för att kunna uttrycka proteiner rekombinant som på sikt kan användas för diagnostik eller behandling som i sin tur kan rädda människoliv? I detta specifika fall kanske nyttan väger tyngst, men om syftet med de uttryckta målproteinerna är andra industriella applikationer kanske djurens lidande är viktigare att ta hänsyn till? Många konsekvensetiker skulle nog hävda det, givetvis beroende på hur nyttiga dessa industriella applikationerna är.

Samtidigt innebär utveckling av däggdjursexpressionssystem inte nödvändigtvis massavriktning av däggdjur eftersom nya celler inte behöver extraheras när en odlingsbar cellinje väl etablerats. Är detta en förmildrande omständighet? Det kan helt klart tyckas förmildrande rent konsekvensetiskt att det inte är särskilt många djur som kommer till skada. Ur ett pliktetiskt perspektiv kan det dock tyckas oacceptabelt att något djur kommer till skada överhuvudtaget, samtidigt som en del kan hävda att djur inte har några rättigheter och därmed inte ser något problem.

Många kan nog enas om att prokaryota expressionssystem känns mer etiskt korrekt än uttryck i däggdjursceller. Detta eftersom bakterier, trots deras livsviktiga instrumentella värde i exempelvis alla högre eukaryota organisms immunsystem, ofta inte anses ha samma egenvärde och rättigheter som ett däggdjur (Cockell 2005). Faktum är ju att vi människor kallblodigt dödar mängder av bakterier varje gång vi städar eller använder handsprit. Det finns nog ingen som vill hävda att mikroberna inte har en betydande roll för allt annat liv här på jorden (Cockell 2011). Frågan handlar i det här fallet inte om att ta död på mikrosamhällen i naturen, utan istället att vid proteinframställning odla populationer för

industriella tillämpningar som är till gagn för oss människor. I detta avseende kan det inte anses att däggdjur och mikrober har ett lika stort värde. Däremot kan även användandet av mikroorganismer innebära dilemman, exempelvis vad gäller säkerhet. Detta då det gäller handhavandet eller skapandet av sjukdomsframkallande mikroorganismer. Dessutom finns risker för att en modifierad organism skulle konkurrera ut en naturlig population, vilket skulle kunna skada ekosystemet.

6.4 Riktlinjer kring säkerhet vid användningen av patogena värdceller är livsviktig

Extra försiktighetsåtgärder krävs vid hanteringen av värdceller som kan vara sjukdomsorsakande för oss människor eller skadliga för naturliga ekosystem. Av denna anledning klassificerar man organismer utifrån deras virulens och patogenitet, varpå endast en certifierad anläggning som klarar detta har lov att användas vid proteinframställning. GRAS* är en säkerhetsklassificering av organismer, utfärdat av amerikanska FDA, som innebär att de är säkra att använda i läkemedels- och livsmedelsproduktion (Lubertozzi & Keasling 2009). En annan säkerhetsklassificering är "biologisk skyddsnivå", som på en skala 1 till 4 talar om vilka skyddsåtgärder som krävs vid hantering av organismen (Janosko *et al.* 2016). Ytterligare en klassificering, utfärdat av amerikanska *Centers for Disease Control* (CDC), delar upp potentiella biologiska vapen i olika bioterror-kategorier samt tar upp risker och prioriteringar vid forskning av dessa (Janosko *et al.* 2016).

Med andra ord finns det många olika klassificeringar av organismer som är kopplade till just säkerhet. Dessa kan dessutom delvis skilja sig mellan länder, vilket kan göra det problematiskt. Det gäller alltså att hålla sig till de klassificeringar som gäller för den aktuella organismen i det aktuella landet. Givetvis måste avvägningar göras ifall man väljer att använda potentiellt farliga organismer – är det värt att använda en kraftigt patogen värdcell för att uttrycka heterologa proteiner? Även om det finns anläggningar som uppfyller de krav som krävs för hanteringen, finns det fortfarande risker och sannolikt innebär det även höga kostnader. Att föredra är därför helt klart organismer med GRAS-klassificering och låg biologisk skyddsnivå för att minimera riskerna för sjukdomsspridning, miljöförstöring eller biologisk krigsföring. Frågan kvarstår dock – hur ska forskare hantera en situation där det visar sig att en livsfarlig organism samtidigt är ett revolutionerande expressionssystem? För att besvara denna fråga krävs goda kunskaper inom området, en utförlig riskanalys och ett etiskt tankesätt.

6.5 Förändra organismers genom – etiskt fel enligt vissa

Utöver de ovan diskuterade jämförelserna kring lidande, mattillgång, egenvärde och samhällsnytta är det argument som av vissa kan användas emot rekombinant proteinframställning detsamma som kan användas emot hela biotekniken; att det är oetiskt att överhuvudtaget förändra organismers genom.

6.5.1 Särskilda fall – livsåskådningar

För detta argument är det troligtvis flera olika livsåskådningar som ligger till grund, exempelvis kulturella och religiösa livsåskådningar snarare än vetenskapligt baserade argument (Hielscher *et al.* 2016). Faktum är dock att vi har manipulerat våra grödor och boskapsdjur med avseende på växtförädling och avel sedan jordbruksrevolutionen omkring 12 000 år sedan (Larson *et al.* 2014). Då 75 % av all världens mat idag kommer från tolv växtarter och fem djurarter (FAO, What is Agrobiodiversity?) är det svårt att tro att någon av dessa bär mycket likhet till dess anfäder. Dessa har ju över tid genomgått bestående förädling via selektion, bestrålning eller andra etablerade metoder. Även om det kan tyckas finnas moraliska skäl till att det skulle vara fel att manipulera arter så är det ett faktum att nästan alla våra grödor och djur som vi nyttjar idag påverkats av oss människor i någon mån. Vare sig de känner till det eller inte.

6.5.2 Andra farhågor kring genomförändringar

Om argumentet handlar om negativ påverkan på biodiversiteten så är inte tanken med rekombinant proteinframställning att i främsta syfte producera mat till djur eller människor. Dessa mikroorganismer som producerar proteinet av intresse behöver dessutom speciella anläggningar, de är därför ingenting som "planteras" ute i naturen för att sedan avverkas.

Det argument som kvarstår är framförallt risker, och som med allt annat som utgör en risk för natur eller människor så behövs en riskanalys göras varpå passande riktlinjer och metoder kan tillämpas vilket behandlas tidigare i texten (se rubriken "Riktlinjer kring säkerheten vid användningen av patogena värdceller är livsviktig").

6.6 Sammanfattande jämförelse mellan framställning rekombinant och via extrakt

Vid jämförelse av proteinframställning från de två metoderna med avseende på lidande, mattillgång, organismers egenvärde och samhällsnyttan så finns det inte så mycket som talar emot rekombinanta värdorganismer. Säkerhetsfrågan är alltid någonting som måste tas hänsyn till i varje enskilt fall och därför finns det etablerade säkerhetsklassificeringar. Tanken är att dessa skall underlätta just vilken praxis och metod som är lämplig för att säkerhetsställa att ingen onödig skada tillkommer på människor, djur eller miljön.

7. Tack till

Gruppen vill passa på att tacka Karin Stensjö för hennes vägledning och råd genom projektets gång. Vi vill tacka Daniel Larsson som, med en optimistisk och glad ton, snabbt svarat på alla frågeställningar och oklarheter som uppkommit under projektets gång. Adrian Suarez som med sina trettio års erfarenhet inom fältet svarade på de frågor och funderingar vi hade i projektets början. Vi vill tacka Lena Henriksson för en otroligt lärorik, välstrukturerad och praktisk kurs med givande föreläsningar, diskussioner och övningar. Vi vill varmast tacka Kristina Sweningsson för att hon sponsrade vår teambuilding-aktivitet på *Escape Room* i Uppsala. Vi vill tacka Jessica Nihlén Fahlquist för hennes tankar och ideér kring vår etiska analys. Slutligen, men inte desto mindre, vill vi tacka Thermo Fisher för deras förtroende att låta oss studenter genomföra det här litteraturprojektet. Det har varit givande för oss att författa ett biotekniskt litteraturprojektet av det här slaget och vi hoppas verkligen att Thermo Fisher finner materialet värdefullt!

8. Referenser

- Aboulnaga EA, Zou H, Selmer T, Xian M. 2018. Development of a plasmid-based, tunable, tolC-derived expression system for application in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Biotechnology* 274: 15–27.
- Adivitiya, Dagar VK, Khasa YP. 2017. Yeast Expression Systems: Current Status and Future Prospects. *Yeast Diversity in Human Welfare*, s. 215–250. Springer, Singapore.
- An JA, Yim SS, Jeong KJ. 2013. Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the Porin B signal peptide. *Protein Expression and Purification* 89: 251–257.
- Andrea-Anneliese K, Reinhard B, Peter H, Katarina K, Maria B, Berith W, Buerk S, Stefan L, Siegmund R. 2014. Transduction of Proteins into *Leishmania Tarentolae* by Formation of Non-Covalent Complexes With Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Cellular Biochemistry* 115: 243–252.
- Balasubramanian A, Ponnuraj K. 2010. Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure. *Journal of Molecular Biology* 400: 274–283.
- Barnard GC, Henderson GE, Srinivasan S, Gerngross TU. 2004. High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. *Protein Expression and Purification* 38: 264–271.
- Basile G, Peticca M. 2009. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology* 43: 273.
- Billman-Jacobe H, Hodgson AL, Lightowlers M, Wood PR, Radford AJ. 1994. Expression of ovine gamma interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1641–1645.
- Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. 2011. Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology* 127: 637–645.
- Bredell H, Smith JJ, Prins WA, Görgens JF, Zyl V, H W. 2016. Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*.
- Broekhuijsen MP, Mattern IE, Contreras R, Kinghorn JR, van den Hondel CAMJJ. 1993. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of Biotechnology* 31: 135–145.
- Cano-Garrido O, Rueda FL, Sánchez-García L, Ruiz-Ávila L, Bosser R, Villaverde A, García-Fruitós E. 2014. Expanding the recombinant protein quality in *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 13: 167.
- Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. 2012. Cell-free protein synthesis: Applications come of age. *Biotechnology Advances* 30: 1185–1194.
- Carneiro LEP. 2016. Environmentally-related parasitic diseases in tropical countries. *Journal of Bacteriology & Parasitology*.
- Carrera Pacheco SE, Hankamer B, Oey M. 2018. Optimising light conditions increases recombinant protein production in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Algal Research* 32: 329–340.
- Çelik E, Çalık P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30: 1108–1118.
- Chen R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30: 1102–1107.
- Cockell CS. 2011. Microbial rights? *EMBO Reports* 12: 181.
- Cockell C. 2005. The value of microorganisms. *Environmental Ethics* 27: 375–390.

- Conesa A, Jeeves D, Archer DB, Hondel CAMJJ van den, Punt PJ. 2002. Calnexin Overexpression Increases Manganese Peroxidase Production in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 846–851.
- Cox MM, Nelson DL, 2008. Principles of biochemistry, 5:e uppl. W.H. Freeman and Company, New York.
- Cusano AM, Parrilli E, Marino G, Tutino ML. 2006. A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Microbial Cell Factories* 5: 40.
- Date M, Itaya H, Matsui H, Kikuchi, Y. 2006. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology* 42: 66–70.
- Davoudi N, Hemmati A, Khodayari Z, Adeli A, Hemayatkar M. 2011. Cloning and expression of human IFN- γ in *Leishmania tarentolae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1893–1899.
- Decker EL, Reski R. 2008. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31: 3–9.
- Decker EL, Wiedemann G, Reski R. 2015. Gene Targeting for Precision Glyco-Engineering: Production of Biopharmaceuticals Devoid of Plant-Typical Glycosylation in Moss Bioreactors. *Glyco-Engineering*, s. 213–224. Humana Press, New York, NY,.
- Dingermann T. 2008. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal* 3: 90–97.
- Dusny C, Schmid A. 2016. The MOX promoter in *Hansenula polymorpha* is ultrasensitive to glucose-mediated carbon catabolite repression. *FEMS Yeast Research*.
- Dyo YM, Purton S. 2018. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology* 164: 113–121.
- FAO, What is Agrobiodiversity? WWW-dokument: <http://www.fao.org/docrep/007/y5609e/y5609e02.htm>. Hämtad 2018-05-22.
- Ferrer-Miralles N, Saccardo P, Corchero JL, Xu Z, García-Fruitós E. 2015. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. *Insoluble Proteins*, s. 1–24. Humana Press, New York, NY,
- Ferro R, Rennig M, Hernández-Rollán C, Daley DO, Nørholm MHH. 2018. A synbio approach for selection of highly expressed gene variants in Gram-positive bacteria. *Microbial Cell Factories* 17: 37.
- Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. 2012. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology Advances* 30: 434–439.
- Frelet-Barrand A, Boutigny S, Moyet L, Deniaud A, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Bernaudat F, Richaud P, Pebay-Peyroula E, Joyard J, Rolland N. 2010. *Lactococcus lactis*, an Alternative System for Functional Expression of Peripheral and Intrinsic Arabidopsis Membrane Proteins. *PLoS ONE* 5: e8746.
- Gabarró MV, Gullón S, Vicente RL, Caminal G, Mellado RP, López-Santín J. 2017. A *Streptomyces lividans* SipY deficient strain as a host for protein production: standardization of operational alternatives for model proteins. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92: 217–223.
- Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 1879–1890.
- Giuliani M, Parrilli E, Ferrer P, Baumann K, Marino G, Tutino ML. 2011. Process optimization for recombinant protein production in the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Process Biochemistry* 46: 953–959.
- Glenting J, Poulsen LK, Kato K, Madsen SM, Frøkiær H, Wendt C, Sørensen HW. 2007. Production of Recombinant Peanut Allergen Ara h 2 using *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 6: 28.
- Gonzalez-Lobato L, Chaptal V, Molle J, Falson P. 2016. *Leishmania tarentolae* as a Promising Tool for Expressing Polytropic and Multi-Transmembrane Spans Eukaryotic Membrane Proteins: The Case of the ABC Pump ABCG6. *Heterologous Expression of Membrane Proteins*, s. 119–131. Humana Press, New York, NY,

- Gómez S, López-Esteba M, Fernández FJ, Suárez T, Vega MC. 2016. Alternative Eukaryotic Expression Systems for the Production of Proteins and Protein Complexes. *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*, s. 167–184. Springer, Cham.
- Gregory JA, Shepley-McTaggart A, Umpierrez M, Hurlburt BK, Maleki SJ, Sampson HA, Mayfield SP, Berin MC. 2016. Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1541–1550.
- Gruber S, Hagen J, Schwab H, Koefinger P. 2014. Versatile and stable vectors for efficient gene expression in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Biotechnology* 186: 74–82.
- Gruber S, Schwab H, Koefinger P. 2015. Versatile plasmid-based expression systems for Gram-negative bacteria—General essentials exemplified with the bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *New Biotechnology* 32: 552–558.
- Gruber S, Schwendenwein D, Magomedova Z, Thaler E, Hagen J, Schwab H, Heidinger P. 2016. Design of inducible expression vectors for improved protein production in *Ralstonia eutropha* H16 derived host strains. *Journal of Biotechnology* 235: 92–99.
- Habibi P, Prado GS, Pelegrini PB, Hefferon KL, Soccol CR, Grossi-de-Sa MF. 2017. Optimization of inside and outside factors to improve recombinant protein yield in plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 130: 449–467.
- Hamed MB, Karamanou S, Ólafsdóttir S, Basílio JSM, Simoens K, Tsois KC, Mellaert L, Guðmundsdóttir EE, Hreggvidsson GO, Anné J, Bernaerts K, Fridjonsson OH, Economou A. 2017. Large-scale production of a thermostable *Rhodothermus marinus* cellulase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 16: 232.
- Hemmerich J, Rohe P, Kleine B, Jurischka S, Wiechert W, Freudl R, Oldiges M. 2016. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories* 15: 208.
- Hielscher S, Pies I, Valentinov V, Chatalova L. 2016. Rationalizing the GMO Debate: The Ordonomic Approach to Addressing Agricultural Myths. *International Journal of Environmental Research and Public Health*
- Hiss M, Laule O, Meskauskiene RM, Arif MA, Decker EL, Erxleben A, Frank W, Hanke ST, Lang D, Martin A, Neu C, Reski R, Richardt S, Schallenberg-Rüdinger M, Szövényi P, Tiko T, Wiedemann G, Wolf L, Zimmermann P, Rensing SA. 2014. Large-scale gene expression profiling data for the model moss *Physcomitrella patens* aid understanding of developmental progression, culture and stress conditions. *The Plant Journal* 79: 530–539.
- Hoang H-D, Maruyama J, Kitamoto K. 2015. Modulating Endoplasmic Reticulum-Golgi Cargo Receptors for Improving Secretion of Carrier-Fused Heterologous Proteins in the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 533–543.
- Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, Stadlmann J, Fischer R, Hellwig S. 2010. Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering* 107: 278–289.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2: 208–218.
- Huang K, Badger M, Haney K, Evans SL. 2007. Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification* 53: 325–330.
- Huang L-F, Tan C-C, Yeh J-F, Liu H-Y, Liu Y-K, Ho S-L, Lu C-A. 2015. Efficient Secretion of Recombinant Proteins from Rice Suspension-Cultured Cells Modulated by the Choice of Signal Peptide. *PLoS ONE*.
- Huang T-K, McDonald KA. 2009. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal* 45: 168–184.
- Huang T-K, McDonald KA. 2012. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology Advances* 30: 398–409.

Janosko K, Holbrook MR, Adams R, Barr J, Bollinger L, Newton JT, Ntiforo C, Coe L, Wada J, Pusi D, Jahrling PB, Kuhn JH, Lackemeyer MG. 2016. Safety Precautions and Operating Procedures in an (A)BSL-4 Laboratory: 1. Biosafety Level 4 Suit Laboratory Suite Entry and Exit Procedures. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*

Jena bioscience, LEXSY - Eukaryotic Protein Expression. WWW-dokument:
https://www.jenabioscience.com/images/b3e879b381/Lexsy_brochure_web.pdf. Hämtad 2018-05-17

Jiaju M, Tushar Ramesh P, Zhen-Xing L, Hong L. 2017. Optimisation of an extraction technique of fish allergens suitable for detection and diagnosis. *Czech Journal of Food Sciences* 35: 24–31.

Jin H, Cantin GT, Maki S, Chew LC, Resnick SM, Ngai J, Retallack DM. 2011. Soluble periplasmic production of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification* 78: 69–77.

Johns AMB, Love J, Aves SJ. 2016. Four Inducible Promoters for Controlled Gene Expression in the Oleaginous Yeast *Rhodotorula toruloides*. *Frontiers in Microbiology*.

Jones JD. 2015. *Leishmania tarentolae*: an alternative approach to the production of monoclonal antibodies to treat emerging viral infections. *Infectious Diseases of Poverty*.

Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, Hou H. 2016. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*

Kianmehr A, Mahrooz A, Oladnabi M, Safdari Y, Ansari J, Veisi K, Evazalipour M, Shahbazmohammadi H, Omidinia E. 2016. Purification and Characterization of Recombinant Darbeoetin Alfa from *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology* 58: 566–572.

Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H. 2003. Secretion of Active-Form Streptovercillium mobaraense Transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: Processing of the Pro-Transglutaminase by a Cosecreted Subtilisin-Like Protease from *Streptomyces albobriseolus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 358–366.

Kim N-S, Yu H-Y, Chung N-D, Shin Y-J, Kwon T-H, Yang M-S. 2011. Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expression and Purification* 76: 121–126.

Kitamoto N, Ono N, Yoshino-Yasuda S. 2015. Construction of Quintuple Protease and Double Amylase Gene Deletant for Heterologous Protein Production in *Aspergillus oryzae* KBN616. *Food Science and Technology Research* 21: 297–307.

Klatt S. 2013. Evaluation of the protozoan parasite *L. tarentolae* as a eukaryotic expression host in biomedical research. Freie Universität Berlin, Freie Universität Berlin, Germany

Klatt S, Konthur Z. 2012. Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microbial Cell Factories* 11: 97.

Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA. 2007. Hepatitis B surface antigen expression in NT-1 cells of tobacco using different expression cassettes. *Biologia Plantarum* 51: 467–471.

Kushnir S, Cirstea IC, Basiliya L, Lupilova N, Breitling R, Alexandrov K. 2011. Artificial linear episome-based protein expression system for protozoan *Leishmania tarentolae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 176: 69–79.

Lacombe S, Bangratz M, Brizard J-P, Petitdidier E, Pagniez J, Sérémé D, Lemesre J-L, Brugidou C. 2018. Optimized transitory ectopic expression of promastigote surface antigen protein in *Nicotiana benthamiana*, a potential anti-leishmaniasis vaccine candidate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 125: 116–123.

Langer T, Corvey C, Kroll K, Boscheinen O, Wendrich T, Dittrich W. 2017. Expression and purification of the extracellular domains of human glycoprotein VI (GPVI) and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) from *Rattus norvegicus* in *Leishmania tarentolae*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 47: 1008–1015.

Larson G, Piperno DR, Allaby RG, Purugganan MD, Andersson L, Arroyo-Kalin M, Barton L, Climer Vigueira C, Denham T, Dobney K, Doust AN, Gepts P, Gilbert MTP, Gremillion KJ, Lucas L, Lukens L, Marshall FB, Olsen KM, Pires JC, Richerson PJ, Rubio de Casas R, Sanjurjo OI, Thomas MG, Fuller DQ. 2014. Current perspectives

and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 6139–6146.

Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 9: 963–967.

Lee L-Y, Gelvin SB. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* 146: 325–332.

Lee SF, Li Y-J, Halperin SA. 2009. Overcoming codon-usage bias in heterologous protein expression in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 155: 3581–3588.

Lee S-J, Park C-I, Park M-Y, Jung H-S, Ryu W-S, Lim S-M, Tan H-K, Kwon T-H, Yang M-S, Kim D-I. 2007. Production and characterization of human CTLA4Ig expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expression and Purification* 51: 293–302.

Legastelois I, Buffin S, Peubez I, Mignon C, Sodoeyer R, Werle B. 2016. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13: 947–961.

Liang ST, Bipatnath M, Xu YC, Chen SL, Dennis P, Ehrenberg M, Bremer H. 1999. Activities of Constitutive Promoters in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 292: 19–37.

Liénard D, Nogué F. 2009. *Physcomitrella patens*: A Non-Vascular Plant for Recombinant Protein Production. *Recombinant Proteins From Plants*, s. 135–144. Humana Press.

Liu L, Yang H, Shin H, Li J, Du G, Chen J. 2013. Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: from transcription and translation regulation to secretion pathway selection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9597–9608.

Liu X, Yang Y, Zhang W, Sun Y, Peng F, Jeffrey L, Harvey L, McNeil B, Bai Z. 2016. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium Glutamicum*: progress, challenges and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 652–664.

Loh H-S, Green BJ, Yusibov V. 2017. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. *Current Opinion in Virology* 26: 81–89.

Lombraña M, Moralejo FJ, Pinto R, Martín JF. 2004. Modulation of *Aspergillus awamori* Thaumatin Secretion by Modification of bipA Gene Expression. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5145–5152.

Lubertozzi D, Keasling JD. 2009. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances* 27: 53–75.

Mack M, Wannemacher M, Hobl B, Pietschmann P, Hock B. 2009. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. *Protein Expression and Purification* 66: 165–171.

Madzak C. 2015. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 4559–4577.

Maike K, Vanessa K, Simon K, Michael B. 2015. A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level. *Microbial Biotechnology* 8: 253–265.

Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP. 2007. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal* 5: 402–412.

McDonald KA, Hong LM, Trombly DM, Xie Q, Jackman AP. 2005. Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnology Progress* 21: 728–734.

Mohseni AH, Razavilar V, Keyvani H, Razavi MR, Khavari-Nejad RA. 2017. Efficient production and optimization of E7 oncoprotein from Iranian human papillomavirus type 16 in *Lactococcus lactis* using nisin-controlled gene expression (NICE) system. *Microbial Pathogenesis* 110: 554–560.

Morello E, Bermúdez-Humarán LG, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, Poquet I. 2008. *Lactococcus lactis*, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Production and Secretion. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14: 48–58.

Moustafa K, Makhzoum A, Trémouillaux-Guiller J. 2016. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 840–850.

Musoni M, Destain J, Thonart P, Bahama J-B, Delvigne F. 2015. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. *BASE*.

Najafpour GD. 2007. CHAPTER 12 - Production of Citric Acid. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, s. 280–286. Elsevier, Amsterdam.

Nam H-J, Kwon J-Y, Choi H-Y, Kang S-H, Jung H-S, Kim D-I. 2017. Production and Purification of Recombinant Glucocerebrosidase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181: 1401–1415.

Natale P, Brüser T, Driessen AJM. 2008. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778: 1735–1756.

Nationalencyklopedin, glykosylering. WWW-dokument:
<https://www.ne-se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/glykosylering>. Hämtad 2018-05-16.

Nationalencyklopedin, insulin. WWW-dokument:
<https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/insulin>. Hämtad 2018-05-22.

Nature, post-translational modifications. WWW-dokument:
<https://www.nature.com/subjects/post-translational-modifications>. Hämtad 2018-05-16.

Nationalencyklopedin, pseudomonader. WWW-dokument:
<https://www.ne-se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/pseudomonade>. Hämtad 2018-04-27.

Nationalencyklopedin, streptomyceter. WWW-dokument:
<https://www.ne-se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/streptomyceter>. Hämtad 2018-05-03.

Nel S, Labuschagne M, Albertyn J. 2009. Advances in Gene Expression in Non-Conventional Yeasts. I: Satyanarayana T, Kunze G (red.). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, s. 369–403. Springer Netherlands, Dordrecht.

Noda S, Ito Y, Shimizu N, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. 2010. Over-production of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans*. *Protein Expression and Purification* 73: 198–202.

Noda S, Matsumoto T, Tanaka T, Kondo A. 2015. Secretory production of tetrameric native full-length streptavidin with thermostability using *Streptomyces lividans* as a host. *Microbial Cell Factories* 14: 5.

Noreen N, Hooi WY, Baradaran A, Rosfarizan M, Sieo CC, Rosli MI, Yusoff K, Raha AR. 2011. *Lactococcus lactis* M4, a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microbial Cell Factories* 10: 28.

Obom KM, Cummings PJ, Ciafardini JA, Hashimura Y, Giroux D. 2014. Cultivation of Mammalian Cells Using a Single-use Pneumatic Bioreactor System. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*.

Ogaugwu CE, Cheng Q, Fieck A, Hurwitz I, Durvasula R. 2018. Characterization of a *Lactococcus lactis* promoter for heterologous protein production. *Biotechnology Reports* 17: 86–92.

Orellana-Escobedo L, Rosales-Mendoza S, Romero-Maldonado A, Parsons J, Decker EL, Monreal-Escalante E, Moreno-Fierros L, Reski R. 2015. An Env-derived multi-epitope HIV chimeric protein produced in the moss *Physcomitrella patens* is immunogenic in mice. *Plant Cell Reports* 34: 425–433.

Palanichelvam K, Schoelz JE. 2002. A Comparative Analysis of the Avirulence and Translational Transactivator Functions of Gene VI of Cauliflower mosaic virus. *Virology* 293: 225–233.

Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OT. 2004. Production of Recombinant Proteins. *Recombinant Gene Expression*, s. 15–51. Humana Press.

Park H-S, Jun S-C, Han K-H, Hong S-B, Yu J-H. 2017. Chapter Three - Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. I: Sariaslani S, Gadd GM (red.). *Advances in Applied Microbiology*, s. 161–202. Academic Press.

Parrilli E, Giuliani M, Pezzella C, Danchin A, Marino G, Tutino ML. 2010. PssA is required for α -amylase secretion in Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Microbiology* 156: 211–219.

Parrilli E, Tutino ML. 2017. Heterologous Protein Expression in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, s. 513–525. Springer, Cham.

Passamani FRF, Hernandez T, Lopes NA, Bastos SC, Santiago WD, Cardoso M das G, Batista LR. 2014. Effect of Temperature, Water Activity, and pH on Growth and Production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. *Journal of Food Protection* 77: 1947–1952.

Price NC, Nairn J. 2009. *Exploring Proteins a student's guide to experimental skills and methods*. 1:a uppl. Oxford University Press, Oxford New York.

Priede MA, Vanags JJ, Viesturs UE. 2002. Performance of *Aspergillus niger* Cultivation in Geometrically Dissimilar Bioreactors Evaluated on the Basis of Morphological Analyses. 10.

ProCellEx, Procellex platform. WWW-dokument: <http://protalix.com/technology/procellex-platform/>. Hämtad 2018-04-25

Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* 20: 200–206.

Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RMF, Behnke CA, Kirk P, Hokanson CA, Crea R, Mendez M, Mayfield SP. 2010. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal* 8: 719–733.

Raymond F, Boisvert S, Roy G, Ritt J-F, Légaré D, Isnard A, Stanke M, Olivier M, Tremblay MJ, Papadopoulou B, Ouellette M, Corbeil J. 2012. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research* 40: 1131–1147.

Reski R, Parsons J, Decker E. 2015. Moss-made pharmaceuticals: From bench to bedside. *Plant biotechnology journal*.

Retallack DM, Jin H, Chew L. 2012. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expression and Purification* 81: 157–165.

Rippa V, Papa R, Giuliani M, Pezzella C, Parrilli E, Tutino ML, Marino G, Duilio A. 2012. Regulated Recombinant Protein Production in the Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Recombinant Gene Expression*, s. 203–218. Humana Press, Totowa, NJ.

Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LMT, Soria-Guerra RE. 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports* 31: 479–494.

Rosmilah M, Shahnaz M, Meinir J, Masita A, Noormalin A, Jamaluddin M. 2013. Identification of parvalbumin and two new thermolabile major allergens of *Thunnus tonggol* using a proteomics approach. *International Archives of Allergy and Immunology* 162: 299–309.

Saccardo P, Corchero JL, Ferrer-Miralles N. 2016. Tools to cope with difficult-to-express proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 4347–4355.

Sannino F, Giuliani M, Salvatore U, Apuzzo GA, Pascale D de, Fani R, Fondi M, Marino G, Tutino ML, Parrilli E. 2017. A novel synthetic medium and expression system for subzero growth and recombinant protein production in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 725–734.

Santos RB, Abranches R, Fischer R, Sack M, Holland T. 2016. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*.

Schmidt M, Hoffman DR. 2002. Expression Systems for Production of Recombinant Allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* 128: 264–270.

- Schumann, W. 2007. Production of Recombinant Protein in *Bacillus subtilis*. *Advances in Applied Microbiology* 62: 137-189.
- Sevillano L, Vijgenboom E, van Wezel GP, Díaz M, Santamaría RI. 2016. New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 15: 28.
- Shamriz S, Ofoghi H. 2016. Outlook in the application of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 32: 92–106.
- Siddiqi MZ, Cui C-H, Park S-K, Han NS, Kim S-C, Im W-T. 2017. Comparative analysis of the expression level of recombinant ginsenoside-transforming β -glucosidase in GRAS hosts and mass production of the ginsenoside Rh2-Mix. *PLoS ONE*.
- Simoni RD, Hill RL, Vaughan M. 2002. Urease, the First Crystalline Enzyme and the Proof That Enzymes Are Proteins: the Work of James B. Sumner. *Journal of Biological Chemistry* 277: e23–e23.
- Singh SK, Tiendrebeogo RW, Chourasia BK, Kana IH, Singh S, Theisen M. 2018. *Lactococcus lactis* provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from *Plasmodium falciparum*. *Microbial Cell Factories* 17: 55.
- Smith J. J, Burke A, Bredell H, van Zyl H, Görgens J. F. 2012. Comparing cytosolic expression to peroxisomal targeting of the chimeric L1/L2 (Chi Δ H-L2) gene from human papillomavirus type 16 in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 29: 385–393.
- Song AA-L, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories* 16: 55.
- Spasic J, Mandic M, Djokic L, Nikodinovic-Runic J. 2018. *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 3513–3536.
- Stasyk O. 2017. Methylotrophic Yeasts as Producers of Recombinant Proteins. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, s. 325–350. Springer, Cham.
- Storms R, Zheng Y, Li H, Sillaots S, Martinez-Perez A, Tsang A. 2005. Plasmid vectors for protein production, gene expression and molecular manipulations in *Aspergillus niger*. *Plasmid* 53: 191–204.
- Stretton AOW. 2002. The first sequence. Fred Sanger and insulin. *Genetics* 162: 527–532.
- Su C-F, Kuo I-C, Chen P-W, Huang C-H, Seow SV, Chua KY, Yu S-M. 2012. Characterization of an immunomodulatory Der p 2-FIP-fve fusion protein produced in transformed rice suspension cell culture. *Transgenic Research* 21: 177–192.
- Su X, Schmitz G, Zhang M, Mackie RI, Cann IKO. 2012. Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, s. 1–61. Elsevier.
- Sugano Y, Nakano R, Sasaki K, Shoda M. 2000. Efficient Heterologous Expression in *Aspergillus oryzae* of a Unique Dye-Decolorizing Peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1754–1758.
- Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Shen G. 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters* 25: 1087–1092.
- Sun Y, Guo W, Wang F, Zhan C, Yang Y, Liu X, Bai Z. 2017. Transcriptome analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the process of recombinant protein expression in bioreactors. *PLoS ONE*
- Sydow A, Pannek A, Krieg T, Huth I, Guillouet SE, Holtmann D. 2017. Expanding the genetic tool box for *Cupriavidus necator* by a stabilized L-rhamnose inducible plasmid system. *Journal of Biotechnology* 263: 1–10.
- Sztrajaj K., Szczepankowska A.K., Chmielewska-Jeznach M. 2017. Lactic acid bacteria — promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *Journal of Applied Microbiology* 123: 325–339.
- Taheri T, Seyed N, Mizbani A, Rafati S. 2016. *Leishmania*-based expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 7377–7385.

- Takara Bio USA, Pyriithiamine vectors. WWW-dokument: http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Compentent_Cells/Cloning_Vectors/Ecoli-Aspergillus_Shuttle_Vectors. Hämtad 2018-04-20
- Thermo Fisher Scientific, Cell lines. WWW-dokument: <https://www.thermofisher.com/se/en/home/technical-resources/cell-lines.html>. Hämtad 2018-04-26
- Toyofuku Kyoko, Umemura Taka-aki, Yamaguchi Junji. 1998. Promoter elements required for sugar-repression of the RAm3D gene for α -amylase in rice. *FEBS Letters* 428: 275–280.
- Tsuchiya K, Nagashima T, Yamamoto Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Tamura G. 1994. High Level Secretion of Calf Chymosin Using a Glucoamylase-prochymosin Fusion Gene in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58: 895–899.
- Tutino M, Duilio A, Parrilli E, Remaut E, Sannia G, Marino G. 2001. A novel replication element from an Antarctic plasmid as a tool for the expression of proteins at low temperature. *Extremophiles* 5: 257–264.
- UniProt. WWW-dokument: <http://www.uniprot.org/>. Hämtad 2018-05-22.
- van Zutphen T, Baerends RJ, Susanna KA, de Jong A, Kuipers OP, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* 11: 1.
- von Heijne G. 1990. The signal peptide. *The Journal of Membrane Biology* 115: 195–201.
- Unzueta U, Vázquez F, Accardi G, Mendoza R, Toledo-Rubio V, Giuliani M, Sannino F, Parrilli E, Abasolo I, Schwartz S, Tutino ML, Villaverde A, Corchero JL, Ferrer-Miralles N. 2015. Strategies for the production of difficult-to-express full-length eukaryotic proteins using microbial cell factories: production of human alpha-galactosidase A. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 5863–5874.
- Vickery HB. 1950. The Origin of the Word Protein. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 22: 387–393.
- Vigentini I, Merico A, Tutino ML, Compagno C, Marino G. 2006. Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Biotechnology* 127: 141–150.
- Villatoro-Hernández J, Kuipers OP, Saucedo-Cárdenas O, Montes-de-Oca-Luna R. 2012. Heterologous Protein Expression by *Lactococcus lactis*. *Recombinant Gene Expression*, s. 155–165. Humana Press, Totowa, NJ.
- Volodina E, Raberg M, Steinbüchel A. 2016. Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 978–991.
- Ward PP, Lo J-Y, Duke M, May GS, Headon DR, Conneely OM. 1992. Production of Biologically Active Recombinant Human Lactoferrin in *Aspergillus Oryzae*. *Nature Biotechnology* 10: 784–789.
- Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou X, Wyatt RD, Conneely OM. 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/Technology* (Nature Publishing Company) 13: 498–503.
- Weise A, Altmann F, Rodriguez-Franco M, Sjöberg ER, Bäumer W, Launhardt H, Kietzmann M, Gorr G. 2007. High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -fuc-t Δ -xyl-t mutant. *Plant Biotechnology Journal* 5: 389–401.
- Wetzel D, Müller JM, Flaschel E, Friehs K, Risse JM. 2016. Fed-batch production and secretion of streptavidin by *Hansenula polymorpha*: Evaluation of genetic factors and bioprocess development. *Journal of Biotechnology* 225: 3–9.
- Wetzel D, Rolf T, Suckow M, Kranz A, Barbian A, Chan J-A, Leitsch J, Weniger M, Jenzelewski V, Kouskousis B, Palmer C, Beeson JG, Schembecker G, Merz J, Piontek M. 2018. Establishment of a yeast-based VLP platform for antigen presentation. *Microbial Cell Factories* 17: 17.
- Wiebe MG, Karandikar A, Robson GD, Trinci APJ, Candia J-LF, Trappe S, Wallis G, Rinas U, Derkx PMF, Madrid SM, Sisniega H, Faus I, Montijn R, Hondel CAMJJ van den, Punt PJ. 2001. Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 164–174.

- Xie B, Bishop S, Stessman D, Wright D, Spalding MH, Halverson LJ. 2013. *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B12-producing bacteria. *The ISME Journal* 7: 1544–1555.
- Xu J, Okada S, Tan L, Goodrum KJ, Kopchick JJ, Kieliszewski MJ. 2010. Human growth hormone expressed in tobacco cells as an arabinogalactan-protein fusion glycoprotein has a prolonged serum life. *Transgenic Research* 19: 849–867.
- Yada S, Huang G, Lapsley K. 2013. Natural variability in the nutrient composition of California-grown almonds. *Journal of Food Composition and Analysis* 30: 80–85.
- Yagnik B, Patel S, Dave M, Sharma D, Padh H, Desai P. 2016. Factors Affecting Inducible Expression of Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Shigella dysenteriae* Type-1 in *Lactococcus lactis* Using Nisin Inducible Controlled Expression (NICE). *Indian Journal of Microbiology* 56: 80–87.
- Yim SS, An SJ, Choi JW, Ryu AJ, Jeong KJ. 2014. High-level secretory production of recombinant single-chain variable fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 273–284.
- Zhang Q, Ai C. 2016. Development of House Dust Mite Vaccine. *Vaccine Design*, s. 739–751. Humana Press, New York, NY.

Bilaga 1: Expressionssystem som inte nådde hela vägen

1.1 Prokaryota expressionssystem som inte togs med

Bacillus subtilis

Denna bakterie är icke-patogen och etablerad inom matindustrin (Saccardo *et al.* 2016). Fördelarna med bakterien är att den utsöndrar proteiner effektivt, inte producerar endotoxiner (Schumann 2007), har enkla och billiga odlingsmetoder samt har hög celldensitet (Saccardo *et al.* 2016). Nackdelarna är att utsöndringsnivån är låg och inte är optimal för att producera humana proteiner med rätt veckning (Schumann 2007). Detta expressionssystem valdes bort att gå vidare med dels för att den var förhållandevis lik *C. glutamicum* men främst på grund av tidsbrist.

Burkholderia glumae och *Lactobacillus lactis*

Detta expressionssystem valdes bort på grund av brist på information.

Pseudomonas aeruginosa

En bakterie som tillhör släktet *Pseudomonas*, utöver *Pseudomonas fluorescens* som diskuteras ovan, är *Pseudomonas aeruginosa*. Denna ska ha ett bra, välstuderat utsöndringssystem och har uttryckt proteiner med mycket varierande resultat (Chen 2012). Det tycks vara ett osäkert system i avseendet att den helt misslyckats i uttrycket av en del proteiner, tillsammans med det faktum att den är patogen (Chen 2012). På grund av detta utslöts organismen från vidare studier.

Pseudomonas putida

Ytterligare en bakterie ur släktet *Pseudomonas* är *Pseudomonas putida*. Stammen *P. putida* KT2440 är klassad som biosäker och har uttryckt flertalet protein som renats till renhetsgrad omkring 95 %. Dock var dess utbyte lågt (under 5 mg/l) och överträffar inte andra system, såsom *E. coli* (Chen 2012). På grund av detta och behovet av avgränsningar utslöts denna organism från ytterligare utvärdering.

Streptococcus gordonii

En stor fördel gällande *S. gordonii* är att ett allergen från bålgetingsgift har uttryckts med denna bakterie som expressionssystem (Szatraj K. *et al.* 2017). Däremot finns det även information om att bakterien inte kan uttrycka höga nivåer av rekombinanta proteiner (Lee *et al.* 2009). *S. gordonii* valdes bort för att inte tillräckligt mycket information hittades samt på grund av tidsbrist.

1.2 Eukaryota expressionssystem som inte togs med

Trichoderma

I arbetet om filamentösa svampar undersöktes initialt även svampsläktet *Trichoderma*, men på grund av att detta släkte visade stora likheter med *Aspergillus*, valdes *Trichoderma* bort. *Aspergillus* prioriterades över *Trichoderma* eftersom det fanns mer litteratur om *Aspergillus*. Det ska dock tilläggas att vissa studier visar att *Trichoderma* kan vara bättre för att uttrycka heterologa proteiner (Su *et al.* 2012).

Dictyostelium discoideum

En annan eukaryot organism som var intressant att undersöka var amöban *Dictyostelium discoideum* då den har omnämnts i artiklar som ett lovande expressionssystem. Men mängden forskning kring heterolog expression var mycket begränsad då detta system främst tycks ha använts för forskning inom genetik.

Dunaliella salina

Ytterligare en eukaryot organism som utslöts var den gröna mikroalgen *Dunaliella salina*. Detta på grund av att den verkade ha liknande egenskaper som *C. reinhardtii* som även denna är en grön mikroalg. *D. salina* är även mindre etablerad än *C. reinhardtii* och färre artiklar fanns att läsa om organismen.

Lemna minor

Sötvattenväxten *Lemna minor* utslöts på grund av de få artiklar som fanns att läsa om organismen som expressionssystem för rekombinanta proteiner. *L. minor* utslöts även för att det var ovisst om växten kunde odlas i suspension eller inte.

Yarrowia lipolytica

Även *Yarrowia lipolytica* fick utslutas på grund av tidsbrist. Dess förmåga att uttrycka proteiner rekombinant har dock undersökts i över tre decennier så det finns mycket material att tillgå och över 130 proteiner från 80 organismer har uttryckts i *Y. lipolytica*. Som namnet skvallrar om så har den en säregen förmåga att bryta upp fetter och lipider genom hydrolys. *Y. lipolytica* skulle därför även kunna odlas med hjälp av olika kolväteföreningar såväl som för att omvandla dessa till mer eftertraktade oljor eller för att producera proteiner. *Y. lipolytica* har även använts i livsmedel och för att producera olika organiska syror i större utsträckning samt som foder till boskapsdjur i och med att den är rik på bland annat olika fetter (Madzak 2015).

Bilaga 2: Ordlista

% Totalt lösligt protein – TSP (eng. total soluble protein)

% Totalt lösligt protein är ett mått på hur stor andel av de lösliga proteinerna i cellen som är målproteinet. Ofta krävs att utbytet är mer än 10 % av totalt lösligt protein för en kommersiell plattform (Dyo & Purton 2018).

Biologisk skyddsnivå

Biologisk skyddsnivå är den grad av till exempel organisatoriska åtgärder, arbetsrutiner, lokaler och utrustning som ett biologiskt verksamt ämne kräver. Laboratorier som jobbar med biologiskt verksamma ämnen kan delas in i fyra olika skyddsnivåer där ett är den lägsta och fyra är den högsta nivån (*Folkhälsomyndigheten*, skyddsåtgärder).

CHO-celler

CHO-celler är celler erhållna från äggstockar hos kinesiska hamstrar (Reski *et al.* 2015).

Elektroporering

Elektroporering är en transformationsmetod applicerbar på både prokaryoter och eukaryoter. Cellerna behandlas med korta elektriska pulser som leder till att porer bildas temporärt i cellmembranet. Porerna är tillräckligt stora för att cellen ska kunna ta upp DNA, ofta i form av en plasmid, från omgivningen. När de elektriska pulserna försvinner kan membranet ofta återfå sin normala struktur, men många celler dör av den höga spänningen. Därför krävs ett antal större celler vid elektroporering än vid kemiska transformationsmetoder (Mahmood *et al.* 2008).

Endogen

Med endogen menas något som kommer inifrån en organism, alltså har sitt ursprung i organismen och inte från omgivningen eller annan organism (*Nationalencyklopedin*, endogen).

Endotoxiner

Ett endotoxin är ett toxin (giftigt ämne) som finns i och bildas av många gramnegativa bakterier (*Nationalencyklopedin*, endotoxiner).

Expressionssystem

I denna rapport definieras ett expressionssystem som en värdorganism som rekombinant framställer proteiner i produktionssyfte.

Fermentor

En fermentor är en reaktor med reglerbar temperatur, pH och syrehalt där mikroorganismer kan odlas (*Nationalencyklopedin*, fermentor).

Fotoautotrof

En organism är fotoautotrof om den kan utnyttja ljus och oorganiska kolkällor för att utvinna energi (*Nationalencyklopedin*, fotoautotrofi).

Fusionsprotein

Ett fusionsprotein är ett protein som placeras i ena terminalen av målproteinet. Funktionen kan vara att förbättra lösligheten av målproteinet, göra den detekterbar (med till exempel fluorescens), underlätta rening (med en affinitetsmolekyl), få målproteinet att transporteras till en speciell plats i cellen eller ge ett högre uttryck (*The Wolfson Centre for Applied Structural Biology*, Fusion Tag/Protein).

GC-innehåll

GC-innehållet hos en organism avser andelen cytosin-guanin-kvävebaser i dess genom. Ofta anges denna i procent (Hemmerich *et al.* 2016).

Genavstängning

Genavstängning är när uttrycket av en gen regleras så att det avbryts eller underuttrycks. Detta kan ske på både transkriptions- och translationsnivå (*Svensk MeSH*, Genavstängning).

GRAS-certifikat

Att en organism är GRAS (Generally Recognized As Safe)-klassificerad innebär att den säkert kan användas inom läkemedel- och livsmedelsproduktion (Lubertozzi & Keasling 2009).

Heterologt protein

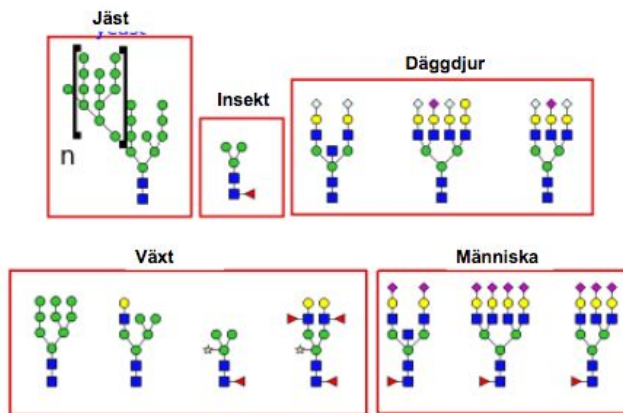
Ett heterologt protein är ett protein som uttrycks av en heterolog gen, alltså en gen som inte naturligt uttrycks i en värdcell utan är främmande för den organism proteinet produceras i (Encyclopedia of Neuroscience 2009, Heterologous Expression).

Heterotrof

En organism som är heterotrof utnyttjar organiska kolföreningar för att utvinna energi (*Nationalencyklopedin*, heterotrofi).

Hyperglykosylering

N-länkad glykosylering är en typ av posttranslationell modifiering hos eukaryoter, men olika organismer inom gruppen har olika glykosyleringsmönster (se figur B2-1). Jästsvampar, i synnerhet *Saccharomyces cerevisiae*, tenderar att bygga längre och flera kolhydratkedjor. Detta kallas för hyperglykosylering och kan innebära en addering av 200-300 mannosgrupper (Conde *et al.* 2004).



Figur B2-1: schematisk illustration av olika typer av glykosylering hos eukaryota organismer. Jästceller tenderar att bygga längre kolhydratkedjor än övriga organismer, representerat av bokstaven n i figuren där n är minst 200 för definitionen av hyperglykosylering. Källa: Bild hämtad och modifierad från Wikimedia Commons: (CC BY-SA 3.0)

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a0/Variety_of_glycans.svg

Induktion/Inducerare

Om vektorsystemet som används innehåller promotorer som är inducerbara, det vill säga kan reglera när proteinet ska uttryckas, krävs att kulturen induceras efter att den uppnått optimal odlingsdensitet. Induktionen innebär att en molekyl som aktiverar promotorn (inducerare) tillsätts vilket aktiverar proteinuttrycket. På så sätt produceras det rekombinanta proteinet vid den tidpunkt som önskas (Maiké *et al.* 2014).

Om vektorsystemet som används innehåller promotorer som är konstitutiva utesluts detta steg.

Kodonoptimering

Kodonoptimering använder genteknik för att öka proteinuttrycket genom att förändra kodonen som kodar för olika aminosyror. Olika modifieringar kan ske på olika positioner på DNA-sekvensen för att anpassa kodonen efter värdorganismen (Mauro & Chappell 2014).

Konjugation

Konjugation är när överföring av genetiskt material, DNA, sker mellan två bakterier som är i fysisk kontakt med varandra (*Nationalencyklopedin*, konjugation).

Litoautotrof

En organism är litoautotrof om den utnyttjar koldioxid som kolkälla samt har oorganiska ämnen som elektrondonator (Sörensson 2006).

Multimert protein

Ett multimert protein är ett protein som består av flera polypeptidkedjor (Youngson. 2004, 2005).

Optisk densitet

Inom mikrobiologi mäts den optiska densiteten av en odling för att kunna avgöra mängder celler (*Biology online*, Optical density).

Organoautotrof

En organism är organoautotrof om den använder organiska molekyler som elektronmottagare i sin metabolism (organo-) och om dess kolkälla kommer från oorganiska källor, till exempel koldioxid (autotrof) (Eiler 2006).

PEG-baserad transformation

PEG-baserad transformation är en vanlig metod för transformering av organismer som vanligtvis har en cellvägg. Metoden består av tre steg där det första är generering av protoplaster, det vill säga celler utan cellvägg. Cellerna behandlas med en blandning av lytiska enzymer som kan bryta ner cellväggen. Det är viktigt att optimera enzymkoncentrationer och behandlingstider för att få ut en så stor mängd användbara protoplaster som möjligt. Nästa steg är att protoplasterna blandas med DNA:t som ska inkorporeras och där är inkubationstiden samt koncentrationen av PEG kritisk för en effektiv transformation. Slutligen sprids blandningen ut på passande agarplattor för återuppbyggandet av cellväggen för de transformerade cellerna (Su *et al.* 2012).

Proteaser

Proteaser är enzymer som bryter ner peptider och proteiner (*Nationalencyklopedin*, peptidaser).

Repressor

En repressor är en molekyl som binder till en nukleotidsekvens och hindrar avläsningen av en gen (*Nationalencyklopedin*, repressor).

Screening

Screening är en metod som används för att sälla fram enskilda produkter med sökta egenskaper (*Nationalencyklopedin*, screening).

Signalpeptid (exempel på ett fusionsprotein)

I rekombinant proteinframställning kan signalpeptider användas för att utsöndra proteiner till endoplasmatiskt retikulum (ER) och vidare via utsöndringsvägen ut ur cellen (Futatsumori-Sugai & Tsumoto 2010).

Specifik aktivitet

Med specifik aktivitet menas en förenings reaktivitet per massenhet, under specifika förhållanden (Foustoukos 2014).

T7-baserat expressionssystem

Ett expressionssystem blir T7-baserat när det använder sig av detta mycket populära vektorsystem. RNA-polymeras från bakteriofag T7 förs in i expressionssystemet med en plasmid, och polymerasets promotor tillsammans med målproteinet med en annan.

T7-polymerasgenen regleras med värme och anledningen till att det är så populärt är just att det är reglerbart, lätt att kontrollera samt tillåter ett högt uttryck (Tabor 2001).

Torr cellvikt (eng. dry cell weight)

Med torr cellvikt menas cellvikten efter torkning, det vill säga utan vatteninnehåll (Wang).

Transformation

Inom proteinframställning används transformation som ett generellt begrepp för att beskriva det tekniska steg då genetiskt material förs in i en cell och sedan att hela eller delar av detta DNA integreras i dess genom (*Svensk MeSH*, Transformation, genetisk).

Transgen

En transgen är en gen, som den inte skulle kunna få sexuellt, införd med hjälp av genteknik till en organisms genom (*Nationalencyklopedin*, transgen).

Utsöndring och utsöndringsvägar

Det finns två sätt att få ut ett uttryckt protein ur ett expressionssystem. Antingen lyseras cellerna och renas därefter (*Sigma Aldrich*, Protein Expression Workflow), eller så utsöndras proteinet ut ur cellen utan att den förstörs. Utsöndringen kan göras av cellen själv eller biotekniskt genom att utnyttja andra organismers utsöndringsvägar. De molekyler som utför själva transporten kallas signalpeptider. Eukaryota utsöndringsvägar skiljer sig från prokaryota. För att utnyttja utsöndringsförmågan hos grampositiva bakterier är det viktigt att skilja på deras huvudsakliga utsöndringsvägar, som brukar benämnas som "Sec" (General Secretion) och den sekundära "Tat" (Twin-arginine translocation). Den förstnämnda katalyserar förflyttning till transmembranet i proteinets oveckade form medan den andra katalyserar förflyttning av proteiner i sin veckade form. De olika utsöndringsvägarna har liknande signalpeptider men stora skillnader i mekanism och i vilka enzymer som katalyserar förflyttning (Natale *et al.* 2008).

Vektorsystem

I denna rapport definieras ett vektorsystem som en plasmid eller ett virus där överföring av generna sker. Då ingår promotor, selektionsmarkör och eventuella fusionsproteiner.

Referenser till ordlista

Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U. (eds) 2009. Heterologous Expression. Encyclopedia of Neuroscience. Springer, Berlin, Heidelberg.

Biology online, Optical density. WWW-dokument: https://www.biology-online.org/dictionary/Optical_density. Hämtad 2018-05-22.

By Dna 621. u.å. Variety of glycans. Hämtad från https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a0/Variety_of_glycans.svg. CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)

Conde R, Cueva R, Pablo G, Polaina J, Larriba G. 2004. A Search for Hyperglycosylation Signals in Yeast Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 279: 43789–43798.

Eiler A. 2006. Evidence for the Ubiquity of Mixotrophic Bacteria in the Upper Ocean: Implications and Consequences. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7431–7437.

Encyclopedia of Neuroscience. 2009. Heterologous Expression. s. 1830–1830. Springer, Berlin, Heidelberg,

Folkhälsomyndigheten. 2016. Skyddsåtgärder. WWW-dokument 2016-04-27: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/mikrobiologi-laboratorieanalyser/biosakerhet-och-bioskydd/riskbedomning/skyddsatgarder/>. Hämtad 2018-05-23.

Foustoukos D. 2014. Specific Activity. Amils R. et al. (eds) *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer, Berlin, Heidelberg

Futatsumori-Sugai M, Tsumoto K. 2010. Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391: 931–935.

Hemmerich J, Rohe P, Kleine B, Jurischka S, Wiechert W, Freudl R, Oldiges M. 2016. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories* 15: 208.

Mahmood T, Zar T, Naqvi SMS. 2008. Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*. *Electronic Journal of Biotechnology* 11: 0–0.

Mauro VP, Chappell SA. 2014. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in molecular medicine* 20: 604–613.

Nam Sun Wang. Experiment no. 9C measurements of cell biomass concentration. University of Maryland.

Nationalencyklopedin, endogen. WWW-dokument: <https://www.ne-se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/endogen>. Hämtad 2018-05-18

Nationalencyklopedin, fermentor. WWW-dokument: <https://www.ne-se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/fermentor>. Hämtad 2018-05-18.

Nationalencyklopedin, fotoautotrofi. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/fotoautotrofi>. Hämtad 2018-05-18.

Nationalencyklopedin, heterotrofi. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/heterotrofi>. Hämtad 2018-05-18.

Nationalencyklopedin, konjugation. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/konjugation>. Hämtad 2018-05-26.

Nationalencyklopedin, peptidaser. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/peptidaser>. Hämtad 2018-05-18.

Nationalencyklopedin, repressor. WWW-dokument: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/repressor>. Hämtad 2018-05-23.

Nationalencyklopedin, screening. WWW-dokument: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/screening>. Hämtad 2018-05-23.

Nationalencyklopedin, transgen. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/transgen>. Hämtad 2018-05-18.

Nationalencyklopedin, endotoxiner. WWW-dokument: <http://www.ne.se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/endotoxiner>. Hämtad 2018-05-24.

NCI Dictionary of Cancer Terms, Fusion proteins. WWW-dokument: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>. Hämtad 2018-05-18.

Reski R, Parsons J, Decker E. 2015. Moss-made pharmaceuticals: From bench to bedside. *Plant biotechnology journal*.

Robert M. Youngson. 2004, 2005. Medical dictionary. multimeric protein. <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/multimeric+protein>. Hämtad 2018-05-22.

Sigma Aldrich, Protein Expression Workflow. WWW-dokument: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/recombinant-protein-expression/protein-expression.html>. Hämtad 2018-05-22.

Su X, Schmitz G, Zhang M, Mackie RI, Cann IKO. 2012. Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, s. 1–61. Elsevier.

Svensk MeSH, Genavstängning. WWW-dokument: <https://mesh.kib.ki.se/term/D020868/gene-silencing>. Hämtad 2018-05-18.

Svensk MeSH, Transformation, genetisk. WWW-dokument: <https://mesh.kib.ki.se/term/D014170/transformation-genetic>. Hämtad 2018-05-18.

Sörensson Fred. 2006. Hur celler får energi från föda (Alberts kap. 13). http://www.gmm.gu.se/courses/Cellbiologi_Distans_2008/Energimetabolism/energimetabolism2.pdf. Hämtad 2018-05-22.

Tabor S. 2001. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 16: Unit16.2.

The Wolfson Centre for Applied Structural Biology, Fusion Tag/Protein. http://wolfson.huji.ac.il/expression/vector/Fusion_protein_Tag.html. Hämtad 2018-05-22.

Bilaga 3: Referenser till tabell 1

- [1] Liu X, Yang Y, Zhang W, Sun Y, Peng F, Jeffrey L, Harvey L, McNeil B, Bai Z. 2016. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium Glutamicum*: progress, challenges and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 652–664.
- [2] Maike K, Vanessa K, Simon K, Michael B. 2015. A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level. *Microbial Biotechnology* 8: 253–265.
- [3] Song AA-L, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories* 16: 55.
- [4] Zhang Q, Ai C. 2016. Development of House Dust Mite Vaccine. *Vaccine Design*, s. 739–751. Humana Press, New York, NY.
- [5] Glenting J, Poulsen LK, Kato K, Madsen SM, Frøkiær H, Wendt C, Sørensen HW. 2007. Production of Recombinant Peanut Allergen Ara h 2 using *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 6: 28.
- [6] Singh SK, Tiendrebeogo RW, Chourasia BK, Kana IH, Singh S, Theisen M. 2018. *Lactococcus lactis* provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from *Plasmodium falciparum*. *Microbial Cell Factories* 17: 55.
- [7] Retallack DM, Jin H, Chew L. 2012. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expression and Purification* 81: 157–165.
- [8] Jin H, Cantin GT, Maki S, Chew LC, Resnick SM, Ngai J, Retallack DM. 2011. Soluble periplasmic production of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification* 78: 69–77.
- [9] Huang K, Badger M, Haney K, Evans SL. 2007. Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification* 53: 325–330.
- [10] Sannino F, Giuliani M, Salvatore U, Apuzzo GA, Pascale D de, Fani R, Fondi M, Marino G, Tutino ML, Parrilli E. 2017. A novel synthetic medium and expression system for subzero growth and recombinant protein production in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 725–734.
- [11] Gruber S, Schwendenwein D, Magomedova Z, Thaler E, Hagen J, Schwab H, Heidinger P. 2016. Design of inducible expression vectors for improved protein production in *Ralstonia eutropha* H16 derived host strains. *Journal of Biotechnology* 235: 92–99.
- [12] Sydow A, Pannek A, Krieg T, Huth I, Guillouet SE, Holtmann D. 2017. Expanding the genetic tool box for *Cupriavidus necator* by a stabilized L-rhamnose inducible plasmid system. *Journal of Biotechnology* 263: 1–10.
- [13] Gabarró MV, Gullón S, Vicente RL, Caminal G, Mellado RP, López-Santín J. 2017. A *Streptomyces lividans* SipY deficient strain as a host for protein production: standardization of operational alternatives for model proteins. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92: 217–223.
- [14] Noda S, Matsumoto T, Tanaka T, Kondo A. 2015. Secretory production of tetrameric native full-length streptavidin with thermostability using *Streptomyces lividans* as a host. *Microbial Cell Factories* 14: 5.
- [15] Liu L, Yang H, Shin H, Li J, Du G, Chen J. 2013. Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: from transcription and translation regulation to secretion pathway selection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9597–9608.

- [16] Sevillano L, Vijgenboom E, van Wezel GP, Díaz M, Santamaría RI. 2016. New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 15: 28.
- [17] Legastelois I, Buffin S, Peubez I, Mignon C, Sodoyer R, Werle B. 2016. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13: 947–961.
- [18] Su X, Schmitz G, Zhang M, Mackie RI, Cann IKO. 2012. Heterologous Gene Expression in Filamentous Fungi. *Advances in Applied Microbiology*, s. 1–61. Elsevier.
- [19] Dyo YM, Purton S. 2018. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology* 164: 113–121.
- [20] Carrera Pacheco SE, Hankamer B, Oey M. 2018. Optimising light conditions increases recombinant protein production in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Algal Research* 32: 329–340.
- [21] Shamriz S, Ofoghi H. 2016. Outlook in the application of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 32: 92–106.
- [22] Smith J. J, Burke A, Bredell H, van Zyl H, Görgens J. F. 2012. Comparing cytosolic expression to peroxisomal targeting of the chimeric L1/L2 (ChiΔH-L2) gene from human papillomavirus type 16 in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 29: 385–393.
- [23] van Zutphen T, Baerends RJ, Susanna KA, de Jong A, Kuipers OP, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* 11: 1.
- [24] Mack M, Wannemacher M, Hobl B, Pietschmann P, Hock B. 2009. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. *Protein Expression and Purification* 66: 165–171.
- [25] Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. 2011. Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology* 127: 637–645.
- [26] Taheri T, Seyed N, Mizbani A, Rafati S. 2016. *Leishmania*-based expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 7377–7385.
- [27] Kushnir S, Cirstea IC, Basiliya L, Lupilova N, Breitling R, Alexandrov K. 2011. Artificial linear episome-based protein expression system for protozoan *Leishmania tarentolae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 176: 69–79.
- [28] Kianmehr A, Mahrooz A, Oladnabi M, Safdari Y, Ansari J, Veisi K, Evazalipour M, Shahbazmohammadi H, Omidinia E. 2016. Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology* 58: 566–572.
- [29] Liénard D, Nogué F. 2009. *Physcomitrella patens*: A Non-Vascular Plant for Recombinant Protein Production. *Recombinant Proteins From Plants*, s. 135–144. Humana Press.
- [30] Santos RB, Abranches R, Fischer R, Sack M, Holland T. 2016. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*.

Bilaga 4: Referenser till tabell 2

- [1] Maike K, Vanessa K, Simon K, Michael B. 2015. A chromosomally encoded T7 RNA polymerase dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level. *Microbial Biotechnology* 8: 253–265.
- [2] Hemmerich J, Rohe P, Kleine B, Jurischka S, Wiechert W, Freudl R, Oldiges M. 2016. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories* 15: 208.
- [3] Date M, Itaya H, Matsui H, Kikuchi, Y. 2006. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology* 42: 66–70.
- [4] Siddiqi MZ, Cui C-H, Park S-K, Han NS, Kim S-C, Im W-T. 2017. Comparative analysis of the expression level of recombinant ginsenoside-transforming β -glucosidase in GRAS hosts and mass production of the ginsenoside Rh2-Mix. *PLoS ONE*.
- [5] Sun Y, Guo W, Wang F, Zhan C, Yang Y, Liu X, Bai Z. 2017. Transcriptome analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the process of recombinant protein expression in bioreactors. *PLoS ONE*.
- [6] Liu X, Yang Y, Zhang W, Sun Y, Peng F, Jeffrey L, Harvey L, McNeil B, Bai Z. 2016. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium Glutamicum*: progress, challenges and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 652–664.
- [7] Date M, Itaya H, Matsui H, Kikuchi, Y. 2006. Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology* 42: 66–70.
- [8] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H. 2003. Secretion of Active-Form Streptovercillium mobaraense Transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: Processing of the Pro-Transglutaminase by a Cosecreted Subtilisin-Like Protease from *Streptomyces albobriseolus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 358–366.
- [9] An JA, Yim SS, Jeong KJ. 2013. Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the Porin B signal peptide. *Protein Expression and Purification* 89: 251–257.
- [10] Yim SS, An SJ, Choi JW, Ryu AJ, Jeong KJ. 2014. High-level secretory production of recombinant single-chain variable fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 273–284.
- [11] Villatoro-Hernández J, Kuipers OP, Saucedo-Cárdenas O, Montes-de-Oca-Luna R. 2012. Heterologous Protein Expression by *Lactococcus lactis*. *Recombinant Gene Expression*, s. 155–165. Humana Press, Totowa, NJ.
- [12] Ferro R, Rennig M, Hernández-Rollán C, Daley DO, Nørholm MHH. 2018. A synbio approach for selection of highly expressed gene variants in Gram-positive bacteria. *Microbial Cell Factories* 17: 37.
- [13] Song AA-L, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories* 16: 55.
- [14] Singh SK, Tiendrebeogo RW, Chourasia BK, Kana IH, Singh S, Theisen M. 2018. *Lactococcus lactis* provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from Plasmodium falciparum. *Microbial Cell Factories* 17: 55.
- [15] Glenting J, Poulsen LK, Kato K, Madsen SM, Frøkiær H, Wendt C, Sørensen HW. 2007. Production of Recombinant Peanut Allergen Ara h 2 using *Lactococcus lactis*. *Microbial Cell Factories* 6: 28.
- [16] Huang K, Badger M, Haney K, Evans SL. 2007. Large scale production of Bacillus thuringiensis PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification* 53: 325–330.

- [17] Jin H, Cantin GT, Maki S, Chew LC, Resnick SM, Ngai J, Retallack DM. 2011. Soluble periplasmic production of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification* 78: 69–77.
- [18] Retallack DM, Jin H, Chew L. 2012. Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expression and Purification* 81: 157–165.
- [19] Chen R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30: 1102–1107.
- [20] pseudomonader - Uppslagsverk - NE.se. WWW-dokument: <https://www-ne-se.ezproxy.its.uu.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/pseudomonader>. Hämtad 2018-a-04-27.
- [21] Giuliani M, Parrilli E, Ferrer P, Baumann K, Marino G, Tutino ML. 2011. Process optimization for recombinant protein production in the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Process Biochemistry* 46: 953–959.
- [23] Sannino F, Giuliani M, Salvatore U, Apuzzo GA, Pascale D de, Fani R, Fondi M, Marino G, Tutino ML, Parrilli E. 2017. A novel synthetic medium and expression system for subzero growth and recombinant protein production in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 725–734.
- [24] Tutino M, Duilio A, Parrilli E, Remaut E, Sannia G, Marino G. 2001. A novel replication element from an Antarctic plasmid as a tool for the expression of proteins at low temperature. *Extremophiles* 5: 257–264.
- [25] Parrilli E, Tutino ML. 2017. Heterologous Protein Expression in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, s. 513–525. Springer, Cham.
- [26] Rippa V, Papa R, Giuliani M, Pezzella C, Parrilli E, Tutino ML, Marino G, Duilio A. 2012. Regulated Recombinant Protein Production in the Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Recombinant Gene Expression*, s. 203–218. Humana Press, Totowa, NJ.
- [27] Sannino F, Giuliani M, Salvatore U, Apuzzo GA, Pascale D de, Fani R, Fondi M, Marino G, Tutino ML, Parrilli E. 2017. A novel synthetic medium and expression system for subzero growth and recombinant protein production in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 725–734.
- [28] Cusano AM, Parrilli E, Marino G, Tutino ML. 2006. A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Microbial Cell Factories* 5: 40.
- [29] Rippa V, Papa R, Giuliani M, Pezzella C, Parrilli E, Tutino ML, Marino G, Duilio A. 2012. Regulated Recombinant Protein Production in the Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Recombinant Gene Expression*, s. 203–218. Humana Press, Totowa, NJ.
- [30] Gruber S, Schwendenwein D, Magomedova Z, Thaler E, Hagen J, Schwab H, Heidinger P. 2016. Design of inducible expression vectors for improved protein production in *Ralstonia eutropha* H16 derived host strains. *Journal of Biotechnology* 235: 92–99.
- [31] Aboulnaga EA, Zou H, Selmer T, Xian M. 2018. Development of a plasmid-based, tunable, tolC-derived expression system for application in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of Biotechnology* 274: 15–27.
- [32] Barnard GC, Henderson GE, Srinivasan S, Gerngross TU. 2004. High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. *Protein Expression and Purification* 38: 264–271.
- [33] Noda S, Ito Y, Shimizu N, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. 2010. Over-production of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans*. *Protein Expression and Purification* 73: 198–202.
- [34] Hamed MB, Karamanou S, Ólafsdóttir S, Basílio JSM, Simoens K, Tsolis KC, Mellaert L, Guðmundsdóttir EE, Hreggvidsson GO, Anné J, Bernaerts K, Fridjonsson OH, Economou A. 2017. Large-scale production of a thermostable *Rhodothermus marinus* cellulase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 16: 232.
- [35] Chen R. 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances* 30: 1102–1107.

- [36] Gabarró MV, Gullón S, Vicente RL, Caminal G, Mellado RP, López-Santín J. 2017. A *Streptomyces lividans* SipY deficient strain as a host for protein production: standardization of operational alternatives for model proteins. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92: 217–223.
- [37] Sevillano L, Vijgenboom E, van Wezel GP, Díaz M, Santamaría RI. 2016. New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories* 15: 28.
- [38] Noda S, Matsumoto T, Tanaka T, Kondo A. 2015. Secretory production of tetrameric native full-length streptavidin with thermostability using *Streptomyces lividans* as a host. *Microbial Cell Factories* 14: 5.
- [39] Najafpour GD. 2007. CHAPTER 12 - Production of Citric Acid. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, s. 280–286. Elsevier, Amsterdam.
- [40] Legastelois I, Buffin S, Peubez I, Mignon C, Sodoier R, Werle B. 2016. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13: 947–961.
- [41] Kitamoto N, Ono N, Yoshino-Yasuda S. 2015. Construction of Quintuple Protease and Double Amylase Gene Deletant for Heterologous Protein Production in *Aspergillus oryzae* KBN616. *Food Science and Technology Research* 21: 297–307.
- [42] Lubertozzi D, Keasling JD. 2009. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances* 27: 53–75.
- [43] Park H-S, Jun S-C, Han K-H, Hong S-B, Yu J-H. 2017. Chapter Three - Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. I: Sariaslani S, Gadd GM (red.). *Advances in Applied Microbiology*, s. 161–202. Academic Press.
- [44] Carrera Pacheco SE, Hankamer B, Oey M. 2018. Optimising light conditions increases recombinant protein production in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Algal Research* 32: 329–340.
- [45] Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LMT, Soria-Guerra RE. 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports* 31: 479–494.
- [46] Xie B, Bishop S, Stessman D, Wright D, Spalding MH, Halverson LJ. 2013. *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement mediated by a mutualistic interaction with vitamin B12-producing bacteria. *The ISME Journal* 7: 1544–1555.
- [48] Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 1879–1890.
- [49] Sun M, Qian K, Su N, Chang H, Liu J, Shen G. 2003. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters* 25: 1087–1092.
- [50] Rasala BA, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RMF, Behnke CA, Kirk P, Hokanson CA, Crea R, Mendez M, Mayfield SP. 2010. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal* 8: 719–733.
- [51] Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP. 2007. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal* 5: 402–412.
- [52] Adivitiya, Dagar VK, Khasa YP. 2017. Yeast Expression Systems: Current Status and Future Prospects. *Yeast Diversity in Human Welfare*, s. 215–250. Springer, Singapore.
- [53] Çelik E, Çalık P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30: 1108–1118.
- [54] Nel S, Labuschagne M, Albertyn J. 2009. *Advances in Gene Expression in Non-Conventional Yeasts. I: Satyanarayana T, Kunze G (red.). Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, s. 369–403. Springer Netherlands, Dordrecht.

- [55] Dusny C, Schmid A. 2016. The MOX promoter in *Hansenula polymorpha* is ultrasensitive to glucose-mediated carbon catabolite repression. *FEMS Yeast Research*.
- [56] van Zutphen T, Baerends RJ, Susanna KA, de Jong A, Kuipers OP, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* 11: 1.
- [57] Bredell H, Smith JJ, Prins WA, Görgens JF, Zyl V, H W. 2016. Expression of rotavirus VP6 protein: a comparison amongst *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, doi 10.1093/femsyr/fow001.
- [58] Stasyk O. 2017. Methylotrophic Yeasts as Producers of Recombinant Proteins. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, s. 325–350. Springer, Cham.
- [59] Andrea-Anneliese K, Reinhard B, Peter H, Katarina K, Maria B, Berith W, Buerk S, Stefan L, Siegmund R. 2014. Transduction of Proteins into *Leishmania Tarentolae* by Formation of Non-Covalent Complexes With Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Cellular Biochemistry* 115: 243–252.
- [60] Langer T, Corvey C, Kroll K, Boscheinen O, Wendrich T, Dittrich W. 2017. Expression and purification of the extracellular domains of human glycoprotein VI (GPVI) and the receptor for advanced glycation end products (RAGE) from *Rattus norvegicus* in *Leishmania tarentolae*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 47: 1008–1015.
- [61] Davoudi N, Hemmati A, Khodayari Z, Adeli A, Hemayatkar M. 2011. Cloning and expression of human IFN- γ in *Leishmania tarentolae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1893–1899.
- [62] Taheri T, Seyed N, Mizbani A, Rafati S. 2016. *Leishmania*-based expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 7377–7385.
- [63] Legastelois I, Buffin S, Peubez I, Mignon C, Sodoyer R, Werle B. 2016. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13: 947–961.
- [64] Decker EL, Reski R. 2008. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31: 3–9.
- [65] Hiss M, Laule O, Meskauskiene RM, Arif MA, Decker EL, Erxleben A, Frank W, Hanke ST, Lang D, Martin A, Neu C, Reski R, Richardt S, Schallenberg-Rüdinger M, Szövényi P, Tiko T, Wiedemann G, Wolf L, Zimmermann P, Rensing SA. 2014. Large-scale gene expression profiling data for the model moss *Physcomitrella patens* aid understanding of developmental progression, culture and stress conditions. *The Plant Journal* 79: 530–539.
- [66] Liénard D, Nogué F. 2009. *Physcomitrella patens*: A Non-Vascular Plant for Recombinant Protein Production. *Recombinant Proteins From Plants*, s. 135–144. Humana Press.
- [67] Santos RB, Abranches R, Fischer R, Sack M, Holland T. 2016. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*.
- [68] Huang T-K, McDonald KA. 2012. Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnology Advances* 30: 398–409.
- [69] Nam H-J, Kwon J-Y, Choi H-Y, Kang S-H, Jung H-S, Kim D-I. 2017. Production and Purification of Recombinant Glucocerebrosidase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181: 1401–1415.
- [70] Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. 2012. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology Advances* 30: 434–439.
- [71] Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA. 2007. Hepatitis B surface antigen expression in NT-1 cells of tobacco using different expression cassettes. *Biologia Plantarum* 51: 467–471.
- [72] Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, Stadlmann J, Fischer R, Hellwig S. 2010. Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering* 107: 278–289.
- [73] Xu J, Okada S, Tan L, Goodrum KJ, Kopchick JJ, Kieliszewski MJ. 2010. Human growth hormone expressed in tobacco cells as an arabinogalactan-protein fusion glycoprotein has a prolonged serum life. *Transgenic Research* 19: 849–867.

- [74] Lee S-J, Park C-I, Park M-Y, Jung H-S, Ryu W-S, Lim S-M, Tan H-K, Kwon T-H, Yang M-S, Kim D-I. 2007. Production and characterization of human CTLA4Ig expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expression and Purification* 51: 293–302.
- [75] Yagnik B, Patel S, Dave M, Sharma D, Padh H, Desai P. 2016. Factors Affecting Inducible Expression of Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Shigella dysenteriae* Type-1 in *Lactococcus lactis* Using Nisin Inducible Controlled Expression (NICE). *Indian Journal of Microbiology* 56: 80–87.
- [76] Gruber S, Schwab H, Koefinger P. 2015. Versatile plasmid-based expression systems for Gram-negative bacteria—General essentials exemplified with the bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *New Biotechnology* 32: 552–558.
- [77] Volodina E, Raberg M, Steinbüchel A. 2016. Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 978–991.
- [78] Wetzell D, Rolf T, Suckow M, Kranz A, Barbian A, Chan J-A, Leitsch J, Weniger M, Jenzelewski V, Kouskousis B, Palmer C, Beeson JG, Schembecker G, Merz J, Piontek M. 2018. Establishment of a yeast-based VLP platform for antigen presentation. *Microbial Cell Factories* 17: 17.
- [80] Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou X, Wyatt RD, Conneely OM. 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 13: 498–503.
- [81] Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology* 20: 200–206.
- [82] Broekhuijsen MP, Mattern IE, Contreras R, Kinghorn JR, van den Hondel CAMJJ. 1993. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of Biotechnology* 31: 135–145.
- [83] Wiebe MG, Karandikar A, Robson GD, Trinci APJ, Candia J-LF, Trappe S, Wallis G, Rinas U, Derkx PMF, Madrid SM, Sisniega H, Faus I, Montijn R, Hondel CAMJJ van den, Punt PJ. 2001. Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 164–174.
- [84] Tsuchiya K, Nagashima T, Yamamoto Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Tamura G. 1994. High Level Secretion of Calf Chymosin Using a Glucoamylase-prochymosin Fusion Gene in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58: 895–899.
- [85] Isiegas C, Parro V, Mellado RP. 1999. *Streptomyces lividans* as a host for the production and secretion of *Escherichia coli* TEM β -lactamase. *Letters in Applied Microbiology* 28: 321–326.
- [86] Santos RB, Pires AS, Abranches R. 2017. Addition of a histone deacetylase inhibitor increases recombinant protein expression in *Medicago truncatula* cell cultures. *Scientific Reports* 7: 16756.
- [87] Stasyk O. 2017. Methylophilic Yeasts as Producers of Recombinant Proteins. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*, s. 325–350. Springer, Cham,
- [88] Otzen M, Wang D, Lunenborg MGJ, Klei IJ van der. 2005. *Hansenula polymorpha* Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *J Cell Sci* 118: 3409–3418.
- [89] Carrera Pacheco SE, Hankamer B, Oey M. 2018. Optimising light conditions increases recombinant protein production in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Algal Research* 32: 329–340.
- [90] Vega MC. 2016. *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. Springer
- [91] Orellana-Escobedo L, Rosales-Mendoza S, Romero-Maldonado A, Parsons J, Decker EL, Monreal-Escalante E, Moreno-Fierros L, Reski R. 2015. An Env-derived multi-epitope HIV chimeric protein produced in the moss *Physcomitrella patens* is immunogenic in mice. *Plant Cell Reports* 34: 425–433.
- [92] Weise A, Altmann F, Rodriguez-Franco M, Sjöberg ER, Bäumer W, Launhardt H, Kietzmann M, Gorr G. 2007. High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Δ -fuc-t Δ -xyl-t mutant. *Plant Biotechnology Journal* 5: 389–401.