Archive of SID

لاکتوکوکوس لاکتیس: یک سیستم بیانی مناسب برای تولید پروتئین های هترولوگ

الهه داورپناه و طاهره طاهری*

تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش ایمونوتراپی و تحقیقات واکسن لیشمانیا

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Tahereh_t@yahoo.com

چکیده

لاکتوکوکوس لاکتیس (*L. lactis*) یک باکتری گرم مثبت از گروه باکتریهای اسید لاکتیک LAB (Lactic Acid Bacteria) است که قدمت طولانی در فرآوری و تولید محصولات لبنی دارد. ویژگیهای منحصربفرد این باکتری، از جمله رشد سریع، تراکم بالای سلولی، قابل استفاده بودن در صنایع تخمیری، عدم تشکیل اجسام انکلوژن (Inclusion body)، نمایش سطحی (Surface display)، عدم تولید اندوتوکسین، فقدان فعالیت پروتئازی خارج سلولی و دارا بودن کمترین فعالیت پروتئازی داخل سلولی، و مهمتر از همه قابلیت ترشح خارج سلولی پروتئین ها، باعث شده تا به عنوان یک میزبان بی خطر و مناسب برای تولید پروتئینهای نوترکیب یوکاریوتی، در تحقیقات و صنعت مورد استفاده قرار گیرد. این باکتری از یک سو یک کارخانه سلولی برای تولید طیف گسترده‌ای از آنتی ژنهای پروتئینی و از سوی دیگر به عنوان میزبانی مناسب برای تحویل یا رساننده پروتئینهای درمانی و مولکولهای فعال زیستی به داخل سلول به شمار می آید. برای این منظور، وکتورهای بیانی اختصاصی و سویه های باکتریایی متعددی برای بیان و تولید پروتئینهای نوترکیب طراحی شده اند که در این مقاله مروری به شرح آنها پرداخته شده است.

واژگان کلیدی: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، سیستم بیان پروتئین.

باکتری های اسید لاکتیک ((Lactic Acid Bacteria (LAB

باکتری های اسید لاکتیک (LAB) باکتری هایی گرم مثبت و غیربیماری زا هستند که کربوهیدرات های تخمیر شده را به اسید لاکتیک تبدیل می کنند (۳۳). در این باکتریها مسیر متابولیکی ناشی از تخمیر گلوکز ممکن است به یکی از دو حالت همگن (Homofermentative) یا ناهمگن (Heterofermentative) صورت گیرد. در حالت اول دو مولکول لاکتات (به عنوان مثال درباکتریهای استرپتوکوک و لاکتوکوک) تولید می شود و در دومی، لاکتات، اتانول و دی اکسید کربن (به عنوان نمونه در باکتری های *Leuconostoc* و برخی از *لاکتوباسیل ها*) تولید می شود (۳۰). این باکتریها بر روی سطوح بدن، سطوح مخاطی و روده یافت می شوند. در روده بزرگ، سبب کاهش pH شده و فعالیت باکتری های پروتئولیتیک را مهار می کنند، همچنین با پوشاندن سطح سلول های پوششی روده، به باکتری های بیماریزا اجازه رشد و فعالیت نمی دهند (۲) . چرا که، pH اسیدی باعث حل شدن اسیدهای آلی می شود و در نتیجه غشای سلولی شکسته شده، و منجر به تخریب عامل بیماری زا می شود.

امروزه به کمک روش های کلاسیک و با استفاده از فنآوری های جدید انواع مختلفی از گونه های نوترکیب LAB با کاربردهای صنعتی و پزشکی تهیه شده است. حداقل سه نوع کاربرد مختلف برای باکتریهای LAB عنوان شده است که شامل استفاده از آن ها در تولید پروتئین های مهم اقتصادی، تولید پروتئین های فعال زیستی در غذاها و تهیه واکسن های زنده اند. از مزایای استفاده از این دسته از باکتری ها در تهیه و تولید واکسن به کم هزینه بودن و تجویز آسان آن ها می توان اشاره کرد.

این باکتریها از طرف اتحادیه اروپا و سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) به عنوان باکتریهای بی خطر ((Generally Recognized As Safe (GRAS) شناخته شده اند و از نظر درجه غذایی (Food grade) به طور گسترده ای در صنایع تخمیر مواد غذایی به ویژه پنیر، ماست و مواردی از این قبیل مورد استفاده قرار می گیرند. همچنین به دلیل تولید اسید لاکتیک نقش مهمی در حفظ مواد غذایی و فرآورده های تخمیر شده دارند. علاوه بر این، برخی از سویه ها با تولید باکتریوسین، خاصیت نگهدارندگی بیشتری دارند، از این رو نقش آنها را در صنایع غذایی قوت می بخشد. باکتریهای LAB شامل جنسهای مختلفی از جمله: *لاکتوباسیلوس* (*Lactobacillus*)، *لاکتوکوکوس* (*Lactococcus*)، *استرپتوکوکوس* (*Streptococcus*)، *کارنوباکتریوم*

www.SID.ir

Archive of SID

(*Carnobacterium*) و *انتروکوکوس* (*Enterococcus*) هستند (۳۰). *لاکتوکوکوس لاکتیس* بهترین گونه در میان لاکتوکوک‌ها و پرمصرف‌ترین باکتری در میان باکتریهای تخمیر کننده مواد غذایی در سراسر جهان است (۹). همچنین، باکتریهای LAB بویژه لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیل‌ها به عنوان ناقل‌های تحویل و رساننده (Delivery) پروتئینهای درمانی در توسعه راهکارهای جدید درمان و پیشگیری نیز کاربرد دارند.

لاکتوکوکوس لاکتیس

علی رغم باور عمومی، این باکتری ابتدا در اجزای مختلف گیاهانی مانند اوکالیپتوس، نخود فرنگی، ذرت و نیشکر کشف شد و گمان می رفت که یک باکتری خفته باشد که پس از مصرف توسط نشخوارکنندگان، در دستگاه گوارش آنها فعال شده و تکثیر می یابد. اما در واقع، در نشخوارکنندگان پس از مصرف گیاهان، باکتری *L. lactis* به غدد پستانی رفته و در آنجا تجمع پیدا کرده و در نهایت به درون شیر راه می یابد (۱).

سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* دارای زیر گونه های *lactis*، *cremoris* و *hordniae* است (۶). دو زیر گونه *lactis* و *cremoris* به طور وسیعی در صنایع و علوم پزشکی کاربرد دارند. زیر گونه *lactis* قادر است در دمای ۴۰°C و pH=9.2 رشد کند، اما *cremoris* فاقد این توانایی است (۲۹). در طی دو دهه اخیر، پیشرفتهای چشمگیری در جهت توسعه ابزارهایی برای شناسایی خصوصیات مولکولی این باکتری از جمله ترانسفورماسیون، دخول و یا حذف ژن، همچنین توسعه سیستمهای بیانی و تنظیم بیان ژن حاصل شده است (۸).

از این باکتری به طور گسترده ای برای بیان پروتئین های هترولوگ به عنوان کاندید دارو یا واکسن های پیشگیری کننده استفاده می شود و حتی می توان آن را جایگزین مناسبی برای سیستمهای بیانی پرکاربرد دیگر از جمله همتای گرم منفی آن یعنی *E. coli* دانست (۳۸). برای تولید پروتئینهای نوترکیب با ساختارهای فضایی طبیعی، انجام تغییرات مناسب پس از ترجمه با صرف حداقل هزینه و تشکیل باندهای دی سولفیدی در پروتئین های درون زاد (Endogenous) طبیعی همیشه چالش برانگیز بوده است. خواص منحصر به فرد باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* و تنوع بالا در ناقلهای کلونینگ و بیانی القا شونده، آن را به عنوان میزبانی بی خطر و مطلوب برای تولید پروتئینهایی با عملکرد ایده آل مورد توجه بیشتری قرار داده است. امروزه این باکتری به طور گسترده ای در بیوتکنولوژی برای تولید پروتئینهای هترولوگ در مقیاس بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مزایای باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای تولید پروتئین نوترکیب (۱۷)

دلایل مختلفی برای مناسب بودن باکتری *L. lactis* جهت بیان و تولید پروتئینهای نوترکیب (بخصوص پروتئینهای غشایی) وجود دارد که عبارت اند از:

۱ – این باکتری دارای رشد سریع و تراکم سلولی بالایی است، به ویژه هنگامی که تحت pH کنترل شده رشد می کند. همچنین قادر به تحمل اکسیژن است اما فسفوریلاسیون اکسیداتیو را انجام نمی دهد. در مقابل، قند را در شرایط بی هوازی به لاکتات تخمیر می کند که این امر سبب می شود که در درون فرمانتورها که فضای کافی برای هوادهی باکتری وجود ندارد تخمیر در مقیاس بالا براحتی انجام شود. علاوه بر آن، این باکتری می تواند در میکروپلیتهای ۹۶ خانه ای کشت داده شود و با سیلیکون یا روغن معدنی پوشانده شود، که برای آزمایشات با توان بالا (High-throughput) بسیار ایده آل است.

۲ – این میکروارگانیسم تنها دارای یک غشای سلولی است که باعث می شود هدف گذاری و انتقال پروتئین درونزاد (Endogenous) براحتی انجام شود. مزیت دیگر تک غشایی بودن آن این است که پروتئینهای غشایی بیان شده مستقیماً در دسترس سوبستراها، مهار کننده ها و نشانگرها قرار می‌گیرند که به مطالعات عملکردی آن در کل سلول کمک می‌کند.

۳ – این باکتری فاقد هر گونه اندوتوکسین بر سطح غشای سلول بوده و دارای ویژگی نمایش آنتی ژنها برسطح سلول (Surface display) بدون نیاز به مراحل کلونینگ و تکنولوژی ترشح خارج سلولی پروتئینها می باشد.

۴ – در مقایسه با *E. coli* که تخمین زده شده است ۷۰ درصد پروتئینهای تولید شده به شکل اجسام انکلوژن (inclusion body) نامحلول بیان می شوند، بیان پروتئینهای غشایی

www.SID.ir

Archive of SID

یوکاریوتی در *لاکتوکوکوس لاکتیس* منجر به تشکیل اجسام انکلوژن نمی شود.

۵ – وجود پروموترهای قوی و قابل تنظیم در *لاکتوکوکوس لاکتیس* امکان بیان پروتئین های سمی را فراهم می سازد. در *E. coli*، بسیاری از پروموترها ذاتاً دچار نشتی هستند، به این معنی که حتی در صورت عدم القا، تا حدودی رونویسی صورت می گیرد که اغلب با فشار انتخابی به تخریب یا پایین نگاه داشتن میزان پلاسمیدها می شود. اما در *L. lactis* به دلیل استفاده از پروموترهای قوی، هیچ فشار انتخابی به منظور نگهداری پلاسمیدها وجود ندارد، بنابراین پلاسمیدها پایدار هستند.

۶ – سطح بیان در باکتری را می توان با غلظت القا کننده خارجی کنترل کرد. بیان کنترل شده پروتیئن تحت پروموترهای قوی، به ویژه برای بیان پروتئین های سمی مفید است، زیرا می تواند سطح بیان را تعدیل کند تا امکان بیان متوسط پروتئین برای جلوگیری از مرگ سلولی فراهم شود.

۷– به دلیل فعالیت نسبتاً ضعیف پروتئازی در این باکتری، پروتئینهای غشایی بیان شده در *لاکتوکوکوس لاکتیس* اغلب پایدارند.

۸– ژنگان باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* کوچک (2.3 ~ Mbp) است و در حدود 2310~ پروتئین را رمزگذاری می کند. اندازه کوچک ژنگان سبب کاهش بخشهای اضافی و تکراری (Redundancy) شده که این خود سبب تسهیل در مطالعات عملکردی پروتئینهای بیان شده می شود. زیرا پروتئینهای درون زاد با عملکرد مشابه احتمالاً وجود ندارند. همچنین به دلیل عدم حضور ناخالصی ها و طبعاً عدم نیاز به فرآیند حذف آنها، تخلیص پروتئینهای بیان شده راحت تر صورت می گیرد.

مجموع این ویژگی ها همراه با امکان لیوفیلیزه کردن و به حالت محلول در آمدن دوباره باکتری، استفاده از آن را در تحقیقات و صنعت آسان کرده است.

محدودیت های باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* (۱۷)

در کنار مزایای ذکر شده، این باکتری نقاط ضعف هایی نیز دارد که غلبه بر آنها براحتی امکان پذیر است.

۱ – یکی از معایب سیستم بیانی *لاکتوکوکوس لاکتیس*، استفاده از کدون غنی شده با نوکلئوتیدهای AT (محتوای GC برابر 37-35 درصد) است که این می تواند بیان ژنهایی با کدون غنی از GC را به دلیل نیاز به tRNA های نادر در هنگام ترجمه سرکوب کند. در نتیجه، فرآیند ترجمه متوقف و ریبوزوم در آغاز فعالیت، در مواجهه با کدونهای نادر، جدا می شود. البته این مشکل براحتی با جایگزین کردن ۱۰–۱۵ کدون غنی از GC در ابتدای پروتئین با کدونهای غنی از AT از طریق PCR، که معمولاً توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* استفاده می شود، قابل اصلاح است. راهکار دیگر برای غلبه بر این مشکل، بهینه سازی کدون کل توالی ژن مورد نظر است. البته با استفاده از این روش، می توان جایگاه های برش آنزیم و برچسب هایی برای خالص سازی پروتئین نیز در توالی ژن تعبیه کرد.

۲ – یکی دیگر از ضعفهای باکتری *L. lactis*، میزان نسبتاً پایین ترانسفورماسیون آن است. به این معنی که پس از ترانسفورماسیون تعداد کمی از سلولهای تغییرشکل یافته به دست می آید. البته، با به کار گیری مقدار بیشتری DNA و یا استفاده از یک سویه مناسب *E. coli* به عنوان میزبان حدواسط، می توان بر این مشکل فائق آمد، زیرا وکتورهای بیانی در این باکتری بخوبی تکثیر می یابند.

۳ – مشکل دیگر این باکتری، مقاومت نسبتاً زیاد لاکتوکوکوس در برابر ترکیبات لیز کننده است. دلیل آن این است که لاکتوکوکوس ها نسبتاً کوچک و کروی شکل بوده و دیواره سلولی ضخیم دارند. از این رو، برای جداسازی DNA پلاسمید، دیواره باکتری باید با استفاده از لیزوزیم در دمای ۵۰°C تخریب شود.

استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان ناقلهای مخاطی برای تحویل پروتئینهای دارویی

چون سطوح مخاطی بدن اولین جایگاه تعامل بین میکروارگانیسم ها و بدن است، سلولهای مخاطی اصلی ترین معبر برای ورود پاتوژنها هستند. مصرف یک واکسن یا دارو از راه مخاطی ساده تر بوده و می تواند پاسخ ایمنی کارآمدتر و با کمترین عوارض جانبی نسبت به واکسنهای سیستمیک را ایجاد کند. مشکل عمده این روش، تجویز مقدار زیاد (۸) پروتئین است زیرا مقداری از آن در سطوح مخاطی مانند دستگاه گوارش تخریب می شود. از این رو، توسعه ناقلهای (Vector) جدید که قادر به انتقال مؤثر مولکولها به بافتهای هدف باشند یک نیاز و یک چالش بیوتکنولوژی است. از

www.SID.ir

Archive of SID

طرفی، به طورکلی ایمن زایی پروتئین های محلول وقتی به صورت خوراکی یا استنشاقی مصرف می شوند اندک است، اما می توان با مهندسی ژنتیک یا با اتصال آن به یک باکتری میزان آن را به طور قابل ملاحظه ای افزایش داد.

از سوی دیگر، محققان باکتریهای بیماری زای ضعیف شده مانند مشتقات *مایکوباکتریوم* و *سالمونلا* را برای تعامل با سطوح مخاطی تولید کرده اند. اما متأسفانه این باکتریها می‌توانند پتانسیل بیماری زایی خود را بازیابند و به همین دلیل در کودکان و بیماران دچار نقص سیستم ایمنی قابل استفاده نیستند (۴). از این رو، یکی از مزیت های مهم *لاکتوکوکوس لاکتیس* استفاده از آن به عنوان یک وکتور زنده برای انتقال داروهای مبتنی بر پروتئین به شیوه ای کاملاً امن است، زیرا همان طور که ذکر شد این میکروارگانیسم در انسان غیرتهاجمی، غیربیماری زا و بی خطر است (۴). بعلاوه، داده های کنونی نیز نشان می دهد که باکتریهای اسید لاکتیک، بویژه *لاکتوکوکوس ها* و *لاکتوباسیل ها*، کاندید های عالی به عنوان یک ناقل تحویل یا رساننده (Delivery) پروتئینهای درمانی، به منظور پیشگیری و یا درمان بیماریها در انسان هستند (۱۳, ۴۱).

استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای بیان پروتئینهای غشایی هترولوگ

پروتئینهای غشایی طیف گسترده ای از فعالیت ها را در فرآیندهای حیاتی، از جمله رشد و تقسیم سلولی، حفظ یکپارچگی و انسجام سلول، انتقال انرژی، تعامل و میانکنش‌های بین سلولی و انتقال بین غشایی را برعهده دارند. بنابراین، پروتئین های غشایی مهمترین گروه پروتئینها از نظر اهداف دارویی محسوب می شوند. تقریباً ۲۵ درصد ژنهای شناسایی شده در ژنگان یوکاریوتها، پروتئینهای متصل به غشاء (Integral membrane proteins) را رمزگذاری می‌کنند. با وجود اهمیت عملکرد این پروتئینها و کاربرد آنها در بیوتکنولوژی، مطالعه پروتئینهای غشایی به دلیل عدم دسترسی به شکل طبیعی آنها در سلولها و نیز خاصیت آب گریزی آنها دشوار است (۸). بعلاوه، بیان این پروتئینها غالباً با مشکلاتی روبروست، که عبارت اند از: ۱) وقتی در سیستمهای هترولوگ نظیر: باکتریها، مخمرها، سلولهای حشرات، سلولهای پستانداران و تخمک های زنوپوس، بیان می شوند سمی هستند؛ ۲) به میزان کم و در فضایی محدود بین محیط وغشاء بیان می شوند؛ ۳) اغلب به صورت اشتباه یا بدون پیچش و تاخوردگی (Unfold) تولید می شوند. اگر چه امروزه تولید ساختارهای سه بعدی از پروتئینهای محلول با ظرفیت (High-throughput) امکان پذیر شده است، اما ساختار سه بعدی تعداد اندکی (کمتر از ۲۰۰) از پروتئین های غشایی تاکنون شناخته شده است (۸). از طرفی میزان بیان اکثر پروتئینهای غشایی پایین است، و برای مطالعات عملکردی و ساختاری نیاز به بیان مقدار فراوانی از پروتئین است. تولید غلظت بالایی از پروتئینهای غشایی یوکاریوتی بیان شده، یک چالش بزرگ در تحقیقات ساختاری و عملکرد آنها به شمار می آید. اما در ۱۰ سال اخیر ثابت شده است که *لاکتوکوکوس لاکتیس* می تواند یک میزبان بسیار مناسب برای تولید انبوه پروتئینهای غشایی فعال (Functional) باشد.

سیستم های بیانی و تولید پروتئینهای نوترکیب در *لاکتوکوکوس لاکتیس*

خوشبختانه با تعیین توالی ژنتیکی چهار سویهٔ فاقد پلاسمید از این باکتری (KW2، IO-1، MG1363 و IL1403)، دانش کافی از بیولوژی و ژنتیک آن به دست آمده است و همین دستاوردها یکی از دلایل پیشرفت این باکتری به عنوان یک ابزار مناسب برای تولید پروتئین است. از این رو، امروزه این باکتریها به عنوان یک میزبان برای بیان پروتئینهای نوترکیب هومولوگ و هترولوگ به طور گسترده ای استفاده می شود (۲۲). **برای افزایش بیان و تولید پروتئین نوترکیب هترولوگ، علاوه بر انتخاب سویه باکتری، شرایط مختلفی از جمله دما، حجم سوسپانسیون، نوع وکتور و نیز جایگاه تولید پروتئین باید بهینه سازی شود. معمولاً تولید پروتئین، در هر دو مقیاس حجم بالا (در فرمانتور) و حجم کم (درفلاسک یا ارلن) صورت می گیرد (۱۹). البته براساس گزارشات، ترشح پروتئینهای نوترکیب در فرمانتور با pH کنترل شده به مقدار قابل توجهی بیشتر از فلاسک است (۳۴). از طرفی، تجمع لاکتات درمحیط کشت مانع از رشد و تولید محصول می شود، اما با کنترل pH سوسپانسیون می‌توان بر این محدودیت فایق آمد (۱۶). در شرایط بهینه با استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* بیش از ۲۰ mg/L پروتئین قابل تولید است (۲۴). جدول ۱ لیستی از پروتئینهای نوترکیب را که در این باکتری تولید شده است نشان می دهد.** البته میزان تولید پروتئین

www.SID.ir

Archive of SID

های نوترکیب در *L. lactis* وابسته به کارایی رونویسی پروموترها است.

جدول ۱- لیست تعدادی از پروتئینهای نوترکیب بیان شده در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس

سویه	پروتئین	پروموتر یا پلاسمید	موقعیت زیر سلولی	فرمانتور یا حجم	محصول	منابع
MG1363	Staphylococcus aureus nuclease	170 inducible promoter	Sec	Fermenter	~2.5 g/L	[15]
MG1363	Staphylococcal HtrA protein	pLB145 and pVE8124-7/ ZitR-regulated Pzit	Sec	Fermenter	~2.2-2.5 mg/L	[34]
NZ9000	Pediocins	-	Sec	200 ml	-	[3]
MG1363	Chimeric fusion protein (GMZ2'.10C)	P170 promoter	-	Fermenter	-	[26]
MG1363	Plasmodium falciparum antigens	-	Sec	Fermenter/ 1 L	1 to 40 mg/L	[37]
MG1363	PfCSP4/38	pSS1	Sec	Fermenter/ 1-5L	~25 mg/L	[36]
NZ9000	1,2-propanediol	pNZ8048	-	Fermenter/ 1 L	1.88 g/L	[35]
NZ3900	Human IFNα-2b	pNZ8148	Sec	-	-	[24]
MG1363	Butanedione	pTD6	Sec	Fermenter	6.7 g/L	[21]

در حال حاضر، سیستم های بیانی متنوعی در *لاکتوکوکوس لاکتیس* برای بیان و کنترل تولید پروتئینهای نوترکیب هترولوگ اعم از سیستمهای بیانی نهادی بیان شونده غیرالقایی (Constitutive) و القا شونده (Inducible) به هر دو شکل طبیعی یا ساختگی (Synthetic) توسعه یافته اند. ابتدا پروموترهای غیرالقایی از کتابخانه ژنگانی باکتری جدا شدند که سطح بیان متغیری را نشان می دادند. مشکل سیستم های غیرقابل القا، تجمع پروتئین در سیتوپلاسم است. سپس، پروموترهای القا پذیر در *لاکتوکوکوس لاکتیس* کشف شدند که با سایر سویه ها برای بیان ژنهای اینترلوکینها، آنتی ژنها و آنزیمها سازگاری یافتند. در اکثر مواقع، به دلیل قابل کنترل بودن بیان پروتئین در یک زمان خاص، استفاده از پروموترهای القا شونده به پروموترهای غیرقابل القا ترجیح داده می شوند (۳۸). در ادامه، عمومی ترین سیستمهای تنظیمی استفاده شده در *لاکتوکوکوس لاکتیس* شرح داده شده است.

پروموترهای با بیان نهادی (Constitutive)

تاکنون ۳۸ پروموتر دائماً بیان شونده در *L. lactis* شناسایی شده است که ظرفیت بیان متفاوتی دارند. در این میان P32 و P45 پروموترهای رایج مورد استفاده اند. همچنین پروموترهای قویتری نیز نظیر پروموترهای P2، P3، P5 و P8 نیز کشف شدند که کارایی رونویسی آن ها بالاتر از پروموتر P45 است (42). از موارد دیگر می توان به P59 از باکتری استرپتوکوکوس کرموریس (*Streptococcus cremoris*) اشاره کرد که به وسیله آن پروتئین نوکلئاز از *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) را در سه سطح سلولی مختلف (سیتوپلاسمی، متصل به دیواره و ترشحی) در *L. lactis* تولید کردند. مقدار پروتئین تولید شده ۲/۵-۳ میلی گرم بود که احتمالاً به دلیل تعداد نسخه های کم پلاسمید و نیز فعالیت پروتئاز خارج سلولی HtrA در *L. lactis* است (۳۲). از آنجایی که این دسته از پروموترها به صورت یکنواخت و پایدار پروتئین هترولوگ را تولید می کنند و نیازی به افزودن القا کننده ندارند، مقرون به صرفه هستند. از طرفی، در مواردی که تعداد زیادی مسیر متابولیکی باید تغییر داده شوند تنها از این دسته از پروموترها می توان کمک گرفت.

سیستم های تنظیمی قابل القا (Inducible promoters) تا به امروز، پروموترهای قابل القای متعددی در *لاکتوکوکوس لاکتیس* شناخته شده اند که یا به وسیله عوامل محیطی مانند دما (از طریق شوک حرارتی) یا pH یا القا کننده هایی همچون روی یا نیسین (nisin) تنظیم می شوند (۲۲). مثلاً، سیستم القایی P170 با استفاده از ویژگیهای باکتریهای LAB مبتنی بر اسیدیته محیط طراحی شده اند. این پروموتر خود القا شونده است و زمانی القا می شود که pH محیط به حدود ۶ یا کمتر برسد. در واقع، پروموتر P170 با کاهش pH محیط

www.SID.ir

Archive of SID

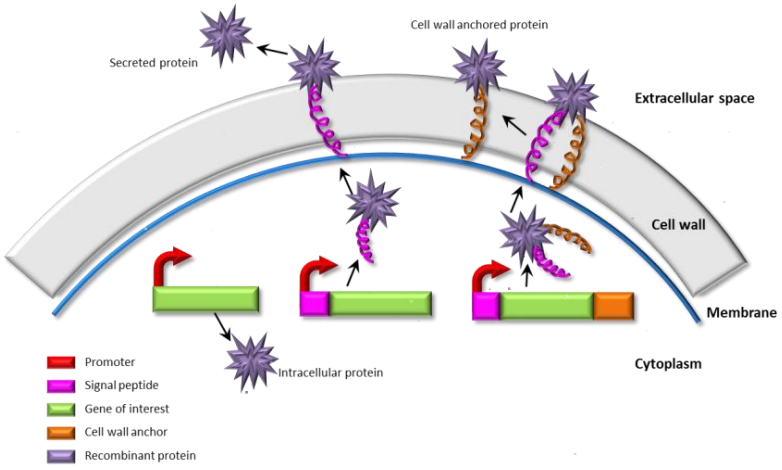
کشت باکتری در فاز ایستای رشد، خود به خود القا شده و سبب تولید مقدار فراوانی پروتئین نوترکیب می شود (۱۸). همچنین، سیستم های بیانی قابل القایی همچون $P_{(Zn)ZitR}$ و Zirex وجود دارند که هر دو براساس در دسترس بودن روی (Zinc) تنظیم می شوند، از این رو "سیستم روی" خوانده می شوند، یعنی براساس حضور روی به ترتیب سرکوب و القا می شوند. پروموتر اپرون *zit* در باکتری *لاکتوکوس لاکتیس* به نام $P_{Zn}ZitR$ با حضور روی تنظیم می شود. در غیاب روی، رپرسور رونویسی ZitR غیرفعال شده و RNA پلیمراز می تواند به پروموتر P_{Zn} متصل شود. در مقابل، در سیستم بیانی Zirex وقتی غلظت مناسبی (غیر سمی) از روی استفاده شود، پروموتر استرپتوکوکال PczcD (که به وسیله رپرسور SczA تنظیم شده) فعال شده و سطح بیان را بالا می برد (۲۳, ۲۸). همچنین گروه دیگری، با تلفیق دو سیستم NICE و Zirex توانستند به طور موفقیت آمیزی پروتئینهای مختلفی را تولید کنند (۲۸).

بدون شک، موفق ترین و متداولترین سیستم بیانی القا پذیر شناخته شده برای تولید پروتئینهای هترولوگ در *لاکتوکوکوس لاکتیس*، سیستم بیانی NICE (Nisin-controlled expression system) است که به کمک یک پروموتر قابل القا با نیسین (Nisin) کنترل و تنظیم می شود. این سیستم در سال ۱۹۹۵ توسط Kuipers و همکاران معرفی شد. سیستم بیانی NICE برای بیان پروتئینهای هومولوگ و هترولوگ در مقیاس انبوه، بیان پروتئینهای غشایی پروکاریوتی و یوکاریوتی، ترشح پروتئین، بیان ژنهایی با محصولات سمی و بررسی ژنهای ضروری بسیار مناسب است. یکی از دلایل اصلی توسعه این سیستم بیانی این است که براساس یک سیستم تنظیمی دو جزئی کار می کند. نیسین یک پپتید کوچک (۳۴ اسیدآمینه ای) باکتریوسین یا ضد میکروبی پایدار درمقابل گرماست که بیوسنتز آن توسط اپرون nis که حاوی یک دسته ۱۱ تایی (*nis*ABTCIPRKE-FG) از ژنهاست رمزگذاری می شود که برروی کروموزوم قرار دارد.

اولین ژن یعنی nisA رمز کننده پیش ساز (Precursor) نیسین است و ژنهای دیگر پروتئینهایی را سنتز می کنند که یا مستقیماً در تغییرات، انتقال و پردازش نیسین (*nisB*، *nisC*، *nicP* و *nisT*) و یا در ایجاد ایمنی در مقابل آن (*nisG*، *nisE*، *nisF* و *nisI*) و یا در تنظیم بیان ژنهای نیسین (*nisR* و *nisK*) نقش دارند. نیسین با اتصال به لیپید II در غشاء باعث ایجاد منافذی در آن و نشت مولکول های کوچک مانند ATP از سلول و در نهایت مرگ سلول می شود. به علت طیف وسیع میزبان های تحت تأثیر نیسین، از آن به عنوان نگهدارنده غذایی استفاده می شود. در سیستم NICE از عناصر تنظیمی موجود در اپرون نیسین (PnisA, *nisK*, *nisR*) استفاده شده است. ژن *nisA* برای ژن ساختمانی نیسین رمزگذاری می شود. اما *nisRK* برای یک سیستم دوجزئی که مسئول القا ژنهای دیگر در میان خوشه ژنی است رمزگذاری می شوند. ژن *nisK* یک پروتئین هیستیدین کیناز را تولید می کند که در غشای سیتوپلاسمی قرار دارد و به عنوان یک رسپتور برای ملکول نیسین عمل می کند و به محض دریافت نیسین، دچار فسفوریلاسیون خودبخودی شده و گروه فسفات را به *nisR* منتقل می کند و *nisR* نیز منجر به القای رونویسی دو پروموتر PnisA و PnisF در خوشه ژنی *nisin* می شود (۳۸).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- شکل شماتیک تولید پروتئین نوترکیب هترولوگ در سه جایگاه مختلف زیر سلولی، داخل سلول، ترشحی به خارج سلول و ترشحی و متصل به دیواره سلول باکتری.

پروموتر PnisA، پرکاربردترین سیستم القا پذیر پروتئین در *لاکتوکوکوس لاکتیس* و باکتریهای گرم مثبت دیگر است. ژنهای مورد نظر در درون پلاسمید و در پایین دست پروموتر PnisA کلون می شوند و پلاسمید نوترکیب حاصل در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* سویه NZ9000 که ژنهای nisRK را بر روی کروموزوم خود حمل می کنند ترانسفورم می شود. افزودن مقدار مناسب نیسین (1-10 ng/ml، زیر حد مهار کنندگی) به عنوان القا کننده به محیط کشت، بیان ژنهای کلون شده تحت کنترل PnisA در سویه های حاوی nisRK را القا می کند. با این حال، برای تولید صنعتی، افزودن نیسین پرهزینه است و درمورد تولید پروتئینهای دارویی، به فرآیندهای پایین دستی برای حذف آن مورد نیاز است (۲۷).

سطوح یا موقعیتهای مختلف زیر سلولی برای بیان پروتئین

قطعاً، موقعیت پروتئین بیان شده در باکتری تأثیر زیادی بر کارآمدی درمان و تعدیل پاسخ ایمنی دارد. علاوه بر آن، همه موقعیتهای سلولی برای تولید پروتئینهای نامحلول مناسب نیستند. تولید طیف گسترده ای از پروتئین ها اعم از آنتی ژن ها، اینترلوکین ها، یا آنزیم ها در موقعیت های مختلف **زیر** سلولی (Subcellular localizations) میسر است. به طور کلی، تولید آنتی ژنهای مورد نظر به وسیله باکتریهای گروه LAB ممکن است در سه مکان سلولی مختلف صورت گیرد. ۱) داخل سلولی، ۲) خارج سلولی، ۳) متصل به دیواره سلول (Cell wall-anchored) (شکل ۱). در اکثر موارد نشان داده شده است که محصول پروتئین در حالت ترشحی خیلی بیشتر از بیان سیتوپلاسمی است (۱۹). مطالعات نشان داده است که بهترین حالت برای بالاترین پاسخ ایمنی معمولاً با آنتی ژنهای بیان شده و متصل به دیواره سلولی که بر روی سطح باکتری قرار دارند به دست می آید. بنابراین در اکثر تحقیقات در زمینه واکسیناسیون، محققان تمایل به انتخاب آنتی ژن هایی دارند که به جای تولید در داخل یا خارج سلول، در سطح سلول بیان شده و در معرض سیستم ایمنی قرار بگیرند. بنابراین سه نوع وکتور پلاسمیدی اختصاصی متناسب با موقعیت مورد نظر طراحی شده اند.

— **وکتورهای pCYT**: وکتورهایی که بدون حضور سیگنال پپتید، پروتئین مورد نظر را در داخل سلول باکتری تولید می کنند. مزیت این روش در امان ماندن پروتئین از محیط سخت و پر آنزیم فضای خارج سلولی است، اما از طرفی، برای آزاد سازی پروتئین نوترکیب تجمع یافته در درون سلول به فضای خارج سلول، سلول باید لیز شود.

— **وکتورهای pSEC**: وکتورهایی هستند که قادر به ترشح پروتئین نوترکیب تولید شده به فضای بیرون از سلول هستند. این شیوه بیان، امکان انتشار پروتئین در فضای خارج سلولی و تعامل مستقیم با محیط را فراهم می سازد. این استراتژی براساس رهایی پروتئین ها به محیط خارج سلول از طریق یک پپتید راهنما صورت می گیرد. از آنجایی که تنها یک پروتئین ترشحی در *L. lactis* وجود دارد، لذا از پپتید راهنما آن (USP45) جهت ترشح پروتئین های نوترکیب کمک گرفته می شود. اخیراً از پپتید راهنما SPK1 گرفته شده از باکتری *پدیوکوکوس پنتاسئوس* (*Pediococcus pentosaceus*) در ترشح پروتئین ها از

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری نوترکیب *L. lactis* نیز استفاده شده است که کارایی ترشحی بالاتری نسبت به پپتید راهنما USP45 دارد، اما میزان پروتئین تولید شده کمتر است. از سوی دیگر، می توان با اضافه کردن پپتید LEISSTCDA به ابتدای پپتید راهنما باعث افزایش کارایی ترشح شد. همچنین مشخص شده است که بیان همزمان پروتئین مورد نظر با پروتئین PrsA از *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) منجر به افزایش ترشح پروتئین می شود. این ویژگی از آن جهت اهمیت دارد که PrsA یک پروتئین ترشحی است که با خاصیت چاپرونی تخریب پروتئین های ترشحی را کاهش می دهد (۲۰). البته با استفاده از این سیستم، پروتئین های رها شده بلافاصله پس از ترشح توسط آنزیمهای پروتئولیتیک تجزیه می شوند. از آنجائی که این باکتری تنها یک پروتئاز (HtrA) دارد، بنابراین شانس تجزیه شدن پروتئین هترولوگ بسیار کم است. از طرفی می توان با ایجاد جهش، عملکرد این پروتئاز را مختل کرد و میزان پروتئین ترشح شده را افزایش داد. به طور کلی، شکل ترشحی پروتئین به علت تخلیص ساده تر، تولید بیشتر و برهمکنش بهتر با هدف بر شکل سیتوپلاسمی آن ارجحیت دارد.

— **وکتورهای pCWA**: در برخی از موارد، وقتی که تولید سیتوپلاسمی و ترشحی پروتئین های ایمونوژن پاسخ ایمنی مناسبی را نشان نمی دهند، اتصال پروتئین بیان شده به غشا گزینه مناسب تری است (۷, ۱۴, ۴۱)، که ترکیبی از مزایای دو حالت قبلی است، یعنی تعاملی بین پروتئین متصل به غشا و محیط، علاوه بر آن محافظت در برابر تخریب پروتئولیتیکی خارج سلولی.

به منظور قرار دادن پروتئین نوترکیب بیان شده بر روی سطح سلول از روش های مختلفی استفاده می شود. به طور کلی، برای نمایش یک پروتئین بر سطح یک سلول، به یک پپتید نشانه برای ترشح و یک پپتید دومین به عنوان لنگر (Anchor) که یک لیپوپروتئین (Lipoprotein anchor) یا پروتئین درون غشایی (Transmembrane anchor) است، برای اتصال به غشای سیتوپلاسمی نیاز هست. معمولترین پپتید نشانه جهت اتصال پروتئین نوترکیب بر روی دیواره سلول، PrtP است که مربوط به پروتئیناز دیواره سلولی *لاکتوکوکوس لاکتیس* است و ژن آن بر روی پلاسمید قرار دارد. بنابراین در سویه های فاقد پلاسمید مشاهده نمی شود. همچنین، می توان پروتئین را از طریق یک موتیف پپتیدی یا توالی LPXTG بر روی دیواره سلولی قرار داد که به طور کووالانسی به دیواره سلول متصل می شود (۲۵). روش دیگر برای نمایش سطحی، استفاده از موتیف های لیزین است که که با لیز خودبخودی AcmA عمل می کند. در این روش می توان پروتئین را در یک سیستم دیگر بیان و خالص سازی کرد و با افزودن آن به سوسپانسیون باکتری *L. lactis*، پروتئین هترولوگ به صورت غیر کووالانسی را به دیواره سلولی باکتری متصل کرد. پس در این روش نیازی به دستکاری ژنتیکی باکتری *لاکتوکوکوس* نیست. پروتئین های یوکاریوتی که نیاز به تغییرات پس ترجمه دارند با این روش براحتی تولید و بر سطح باکتری قرار داده می شوند. روش دیگر استفاده از ذرات GEM (Gram positive enhancer matrix) است. آنتی ژن هایی که به این ذرات متصل شوند قادر به اتصال به پپتیدوگلیکان در سطح باکتری *L. lactis* می شوند. مشکل این روش مجاورت مداوم پروتئین با باکتری است چون در بیان آن نقشی ندارد و تنها به عنوان حامل عمل می نماید (۵).

سویه های متنوع *لاکتوکوکوس لاکتیس* و پلاسمیدهای مرتبط با آنها

یکی از بزرگترین چالشها در تولید پروتئین های نوترکیب در سلولهای تیپ وحشی تولید کم محصول به واسطه خصوصیات ذاتی سلول شامل ناپایداری mRNA، ناپایداری پروتئین هترولوگ (به واسطه فعالیت پروتئولیتیکی داخلی یا خارج سلولی) و سمیت پروتئین نوترکیب تولید شده است. اما استفاده از سویه های نوترکیب *L. lactis* بسیاری از این مشکلات را مرتفع کرده است. دراین راستا، سویه های تجاری متنوعی با فنوتیپهای مختلف از سویه آغازگر لبنی NCDO712 مشتق شده اند. به عنوان مثال، در باکتری *L. lactis*-IL1403، ژن HtrA، تنها پروتئاز خارج سلولی در این باکتری، غیرفعال شده است و در نتیجه پروتئین هترولوگ تولید شده در این سویه پایدار می ماند. لاکتوکوکسی ها برای برخی از اسیدهای آمینه اگزوتروف هستند که این ویژگی مزایایی را برای این سیستم بیانی به ارمغان می آورد . مثلاً، در مواردی به جای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک به عنوان مارکر، از سویه های اگزوتروف *L. lactis* استفاده می شود که در صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارد (۳۱). اولین سیستم انتخاب بدون حضور ژن آنتی بیوتیک بر پایه ژن *LacF* از

www.SID.ir

Archive of SID

اپرون لاکتوز تهیه شد. بیان ژن *LacF* بر روی یک پلاسمید باعث می شود تا سویه موتانت -*Lac* بتواند در حضور لاکتوز رشد کند. همچنین سیستم هایی بر پایه اگزوتروف های ترئونین و پیریمیدین از سویه های *L. lactis* تهیه شده اند که اجازه بیان مؤثر پروتئین های هترولوگ و هومولوگ را در عرصه صنعت می دهند. این دو سیستم پایدارند، مانع رشد نمی شوند و به واسطه حفظ ویژگی های مطلوب مثل تولید اسید لاکتیک و فقدان مارکر آنتی بیوتیکی در مواد غذایی قابل استفاده اند (۱۰).

همچنین، سویه MG1363 یک سویه عاری از پلاسمید است که عموماً برای کلونینگ و بیان ژن در *لاکتوکوکوس لاکتیس* به کار می رود. در کروموزوم باکتری *L. lactis*-cremoris سویه NZ9000 ژن های *nisR/K* در لوکوس ژن آمینوپپتیداز *pepN* از سویه MG1363 وارد شده اند، بنابراین اگر ژنی در پایین دست پروموتر PnisA بر روی پلاسمید کلون شود، براحتی تحت کنترل Nisin بیان می شود. در سویه NZ9100 دو ژن تنظیمی *nisR/K* در یک لوکوس خنثی قرار داده شده اند. سویه NZ3000، سویه استاندارد با ارزش درجه غذایی (Food grade) است. این سویه می تواند در محیط حاوی گلوکز رشد کند، از طرفی اپرون لاکتوز در داخل کروموزوم وارد شده است و حاوی تمام ژنهای درگیر در تخمیر لاکتوز به استثنای ژن *lacF* است. حذف این ژن سبب از دست رفتن توانایی رشد این سویه در حضور لاکتوز می شود، مگر اینکه از یک پلاسمید مناسب حامل ژن *lacF* (مانند pNZ2123، pNZ2122 و یا pNZ2105) استفاده شود. همچنین، سویه میزبان NZ1330 دارای یک سیستم بیانی براساس انتخاب مارکر *alr* بوده و دارای ارزش درجه غذایی است. با حذف ژن *alr* (ژن رمز کننده آلانین racemase) این سویه برای D–آلانین که ضروری است اگزوتروف می شود. بنابراین، این سویه قادر به تبدیل L-Ala به D-Ala نمی باشد. این سویه در حضور پلاسمیدهایی همچون pNZ2125 و یا pNZ7025 که حامل ژن *alr* هستند می تواند در محیطهای حاوی L–آلانین و گلوکز به عنوان منبع کربن رشد کنند. در جدول ۲، لیست سویه های مختلف این باکتری به همراه ویژگی های اختصاصی آنها نشان داده شده است.

از طرفی، خانواده وسیعی از وکتورهای بیانی برای بیان پروتئین در شرایط مختلف داخل سلول، ترشحی و یا ترشح بر روی دیواره سلول توسعه یافته اند (جدول ۳). این پلاسمیدها عموماً رپلیکون مشابهی دارند که از پلاسمید pSH71 باکتری *L. lactis* گرفته شده است و برای تکثیر باید در باکتری های گرم مثبت وارد شوند. برای تکثیر این پلاسمیدها در *E. coli* باید از سویه های recA+ همچون MC1061 استفاده شود یا اینکه مستقیماً در *لاکتوکوکوس لاکتیس* استفاده شود. پلاسمید های حاوی ژن *lacF* که به عنوان مارکر انتخابی استفاده می شوند باید در سویه ای که دارای اپرون لاکتوز و فاقد *lacF* است (مانند سویه NZ3900) ترانسفورم شود (۴۰).

جدول ۲– لیست سویه های نوترکیب باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان میزبان برای بیان و تولید پروتئینهای نوترکیب (۱۱, ۱۲).

سویه	گونه	درجه غذایی	ویژگی ژنتیکی	شاخصها
MG1363		No	Plasmid free	
NZ9000	*L. lactis*	No	*pepN*::*nisRnisK*	دارای سیستم القایی NICE
NZ9100	*L. lactis*	No	*nisRnisK* in neutral locus	دارای سیستم القایی NICE
NZ9130	*L. lactis*	Yes	*nisRnisK, alr*-	اگزوتروف نسبت به آلانین، دارای سیستم القایی NICE
NZ3900	*L. lactis*	Yes	*pepN*::*nisRnisK, lacF*-	اگزوتروف نسبت به لاکتوز، دارای سیستم القایی NICE
NZ3910	*L. lactis*	Yes	*nisRnisK* in neutral locus, *lacF*-	اگزوتروف نسبت به لاکتوز، دارای سیستم القایی NICE
NZ3000		Yes	*lacF*-	اگزوتروف نسبت به لاکتوز
NZ1330		Yes	*alr*-	اگزوتروف نسبت به آلانین

جدول ۳– لیست پلاسمیدهای مختلف مورد استفاده برای بیان پروتئینهای داخل سلولی یا ترشحی به صورت دائم بیان شونده یا القایی در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* (۱۱, ۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

شاخصها	درجه غذایی	وضعیت بیان	وضعیت ترشح	سیگنال پپتید	نام پلاسمید
Cloning vector	-	-	-	-	pNZ124
Cloning vector, lacF	+	-	-	-	pNZ2105
lacA	−	Constitutive	-	-	pNZ2103
pepN, *lacF*	-	Constitutive	-	-	pNZ2122
lacF	+	Constitutive	-	-	pNZ2123
alr	+	Constitutive	-	-	pNZ2125
pepN, alr	+	Constitutive	-	-	pNZ7025
PnisA	-	Inducible	Intracellular	-	pNZ8148
PnisA, *lacF*	Yes	Inducible	Intracellular	-	pNZ8149
PnisA	-	Inducible	Intracellular	-	pNZ8150
PnisA, *lacF*	Yes	Inducible	Intracellular	-	pNZ8151
PnisA, *alr*	Yes	Inducible	Intracellular	-	pNZ8152
PnisA, *gusA*	-	Inducible	Intracellular	-	pNZ8008
nisRK,	-	Inducible	Intracellular	-	pNZ9530
PnisA, cloning in NaeI	-	Inducible	Secreted	PrtP	pNZ8120
PnisA, cloning in EcoRV	-	Inducible	Sectreted	PrtP	pNZ8121
PnisA	-	Inducibl	Secreted	SlpA	pNZ8122
PnisA, cloning in NaeI	-	Inducible	Secreted	Usp45	pNZ8123
PnisA, cloning in EcoRV	-	Inducible	Secreted	Usp45	pNZ8124

اما وکتور pNZ9530 حامل رپلیکون pAMb1 است و فقط در باکتریهای گرم مثبت قابل تکثیر می باشد . در طراحی وکتورهای ترشحی، برای ترشح پروتئین تولید شده از یکی از پپتیدهای نشانه PrtP یا Usp45 مشتق شده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* و یا SlpA گرفته شده از باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (*Lactobacillus bervis*) استفاده شده است (۱۱) .

در این میان سیستمهای بیانی برای مصارف خوراکی (Food grade) هم وجود دارد. از باکتری *E. coli* می توان برای تکثیر تمام پلاسمیدهای اختصاصی *لاکتوکوکوس لاکتیس* به استثناء پلاسمیدهای دارای درجه غذایی (Food-grade) استفاده کرد. زیرا *E. coli* در واقع *+alr* و *+lacF* است و انتخاب این پلاسمیدها با مشکل مواجه می شود.

نتیجه گیری

تولید پروتئینهای نوترکیب در واقع مبنای بسیاری از مطالعات از جمله بررسی ساختاری و فیزیکی پروتئینها، بیومارکرها، مصارف پزشکی – درمانی، بیوتکنولوژی و نیز مطالعات مکانیسمی در شرایط *in vitro* و *in vivo* است. از این رو، تقاضا برای تولید پروتئینهای نوترکیب هترولوگ **در** *in vitro* به طور فزاینده ای رو به افزایش است. برای تولید همه پروتئینهای نوترکیب یک سیستم بیانی واحد وجود ندارد، بنابراین تنوعی از سیستمهای بیانی مختلف اعم از میزبان و وکتور، مهندسی و تهیه شده اند. در هرحال، انتخاب صحیح سیستم بیانی به کار رفته و بهینه سازی دقیق عوامل کلیدی آن منجر به افزایش معنی دار کیفیت و کمیت محصول پروتئینی تولید شده می شود.

اخیراً سیستمهای بیانی یوکاریوتی غیرپاتوژن طبیعی هم برای بیان و تولید پروتئینهای نوترکیب مطرح شده اند که از نظر تولید پروتئین با ساختار طبیعی و ذاتی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۳۹). اما مزیت اصلی استفاده از این باکتریها استفاده خوراکی و سابقه طولانی مصرف آن و باورپذیری آن در اذهان عمومی است. در این میان، *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان یکی از بهترین ابزارها برای بیان و مطالعه پروتئینهای هترولوگ پروکاریوتی و یوکاریوتی توسعه یافته است. همچنین این سیستم به طور گسترده ای به شکل یک ناقل خوراکی/استنشاقی برای تولید پروتئینهای درمانی و پیشگیرانه در *in vivo* به کار رفته و می رود. علاوه برآن می تواند با استفاده از باکتریهای نوترکیب بیان کننده یک آنتی ژن پاسخهای ایمونولوژیکی مؤثری را در سلول یا موجود زنده هدف تحریک نماید.

تشکر و قدردانی: این مطالعه با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران در قالب طرح پژوهشی (طرح های شماره ۹۱۶ و ۱۱۴۷) انجام شده است.

منابع

1. Araújo, W.L., et al. (2009). Characterization of an endophytic bacterial community associated with Eucalyptus spp. 8, 1408-1422.
2. Azizpour, M., et al. (2017). Lactococcus lactis: A new strategy for vaccination. Avicenna journal of medical biotechnology 9, 163.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Back, A., et al. (2016). Recombinant pediocin in L actococcus lactis: increased production by propeptide fusion and improved potency by co-production with PedC. Microbial biotechnology 9, 466-477.
4. Bermúdez-Humarán, L.G., et al. (2011) *Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines*. in *Microbial cell factories*. BioMed Central.
5. Buist, G., (1997) *AcmA of Lactococcus lactis, a cell-binding major autolysin*. [University Library Groningen][Thesis].
6. Cook, D.P., C. Gysemans, and C. Mathieu. (2018). Lactococcus lactis as a versatile vehicle for tolerogenic immunotherapy. Frontiers in immunology 8, 1961.
7. Davarpanah, E., et al. (2020). Lactococcus lactis expressing sand fly PpSP15 salivary protein confers long-term protection against Leishmania major in BALB/c mice. PLoS Neglected Tropical Diseases 14.
8. Frelet-Barrand, A., et al. (2010). Lactococcus lactis, an alternative system for functional expression of peripheral and intrinsic Arabidopsis membrane proteins. PloS one 5, e8746.
9. Gaudu, P., et al. (2019). Genetics of lactococci. Gram-Positive Pathogens, 461-481.
10. Glenting, J., et al. (2002). A plasmid selection system in Lactococcus lactis and its use for gene expression in L. lactis and human kidney fibroblasts. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5051-5056.
11. GmbH, M. (2015). NICE® Expression System forLactococcus lactisThe effective & easy-to-operateNIsin Controlled gene Expressionsystem.
12. GmbH, M. (2016). Constitutive Gene Expression System for Lactococcus lactis and Other Lactic Acid Bacteria. .
13. Hugentobler, F., et al. (2012). Oral immunization using live Lactococcus lactis co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against Leishmania major infection. Vaccine 30, 5726-5732.
14. Hugentobler, F., et al. (2012). Immunization against Leishmania major infection using LACK-and IL-12-expressing Lactococcus lactis induces delay in footpad swelling. PLoS One 7.
15. Jørgensen, C.M., et al. (2013). Recombinant expression of Laceyella sacchari thermitase in Lactococcus lactis. Protein expression and purification 92, 148-155.
16. Jørgensen, C.M., A. Vrang, and S.M. Madsen. (2014). Recombinant protein expression in Lactococcus lactis using the P170 expression system. FEMS microbiology letters 351, 170-178.
17. King, M.S., C. Boes, and E.R. Kunji, (2015) *Membrane protein expression in Lactococcus lactis*, in *Methods in enzymology*. Elsevier. p. 77-97.
18. Kok, J., et al. (2017). The evolution of gene regulation research in Lactococcus lactis. FEMS microbiology reviews 41, S220-S243.
19. Le Loir, Y., et al. (2005). Protein secretion in Lactococcus lactis: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microbial Cell Factories 4, 1-13.
20. Lim, P.Y., et al. (2017). A propeptide toolbox for secretion optimization of Flavobacterium meningosepticum endopeptidase in Lactococcus lactis. Microbial cell factories 16, 1-8.
21. Liu, J.-M., et al. (2021). Food grade microbial synthesis of the butter aroma compound butanedione using engineered and non-engineered Lactococcus lactis. Metabolic Engineering 67, 443-452.
22. Llull, D. and I. Poquet. (2004). New expression system tightly controlled by zinc availability in Lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5398-5406.
23. Llull, D., I.J.A. Poquet, and E. Microbiology. (2004). New expression system tightly controlled by zinc availability in Lactococcus lactis. 70, 5398-5406.
24. Meilina, L., et al. (2021). Heterologous Expression of Interferon α-2b in Lactococcus lactis and its Biological Activity against Colorectal Cancer Cells. Microbiology and Biotechnology Letters 49, 75-87.
25. Michon, C., et al. (2016). Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. Microbial cell factories 15, 70.
26. Mistarz, U.H., et al. (2017). Expression, purification and characterization of GMZ2'. 10C, a complex disulphide-bonded fusion protein vaccine candidate against the asexual and sexual life-stages of the malaria-causing plasmodium falciparum parasite. Pharmaceutical research 34, 1970-1983.
27. Morello, E., et al. (2008). Lactococcus lactis, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. Journal of molecular microbiology and biotechnology 14, 48-58.
28. Mu, D., et al. (2013). Zirex: a novel zinc-regulated expression system for Lactococcus lactis. Applied and environmental microbiology 79, 4503-4508.
29. Nomura, M., et al. (1999). Novel characteristic for distinguishing Lactococcus lactis subsp. lactis from subsp. cremoris. 49, 163-166.
30. Parada, J.L., et al. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Brazilian archives of Biology and Technology 50, 512-542.
31. Plavec, T.V. and A.J.M. Berlec. (2020). Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria. 8, 297.
32. Poquet, I., et al. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in Lactococcus lactis and is required for natural protein processing. Molecular microbiology 35, 1042-1051.

www.SID.ir

Archive of SID

33. Rattanachaikunsopon, P. and P. Phumkhachorn. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. Annals of Biological Research 1, 218-228.
34. Samazan, F., et al. (2015). Production, secretion and purification of a correctly folded staphylococcal antigen in Lactococcus lactis. Microbial cell factories 14, 1-14.
35. Sato, R., et al. (2021). Production of R-and S-1, 2-propanediol in engineered Lactococcus lactis. AMB Express 11, 1-9.
36. Singh, S.K., et al. (2020). The Plasmodium falciparum circumsporozoite protein produced in Lactococcus lactis is pure and stable. Journal of Biological Chemistry 295, 403-414.
37. Singh, S.K., et al. (2018). Lactococcus lactis provides an efficient platform for production of disulfide-rich recombinant proteins from Plasmodium falciparum. Microbial cell factories 17, 1-13.
38. Song, A.A.-L., et al. (2017). A review on Lactococcus lactis: from food to factory. Microbial cell factories 16, 55.
39. Taheri, T., et al. (2016). Leishmania-based expression systems. Applied microbiology and biotechnology 100, 7377-7385.
40. Tarazanova, M., et al. (2016). Plasmid complement of Lactococcus lactis NCDO712 reveals a novel pilus gene cluster. 11, e0167970.
41. Yam, K.K., et al. (2011). Generation and evaluation of A2-expressing Lactococcus lactis live vaccines against Leishmania donovani in BALB/c mice. Journal of medical microbiology 60, 1248-1260.
42. Zhu, D., et al. (2015). Isolation of strong constitutive promoters from Lactococcus lactis subsp. lactis N8. FEMS microbiology letters 362, fnv107.

www.SID.ir