

Artículos originales completos

Expresión y secreción del interferón alfa-2 por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

J. DE LA FUENTE,¹ A. HERRERA,² A. SILVA,¹ S. PÉREZ,¹ M. QUINTANA,¹ J. DELGADO,¹
J. FERNÁNDEZ,¹ Y L. HERRERA¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.

² Centro de Investigaciones Biológicas, Apartado 6996, La Habana, Cuba.

Recibido en febrero de 1988

RESUMEN

El gen del interferón α -2 (IFN α -2) humano fue expresado en la levadura *S. cerevisiae*. Se logra la secreción de esta proteína empleando el péptido señal del factor α de tipo de apareamiento, bajo el control de la secuencia promotora del propio factor α de tipo de apareamiento, y también del fragmento corto del promotor del gen de la gliceraldehído-3- fosfato dehidrogenasa. Los niveles de expresión logrados con estas construcciones son del orden de 10^5 y 10^6 UIF/ml.

SUMMARY

The human interferon α -2 gene was expressed in the yeast *S. cerevisiae*. The protein secretion was achieved by α factor mating type signal peptide under the control of α factor mating type promoter sequence and also by the short GAP promoter. The expression levels obtained are 10^5 and 10^6 IFN U/ml of culture.

INTRODUCCION

La obtención de interferón humano (IFN) por vía recombinante ha permitido disponer de grandes cantidades de este producto para uso clínico (Nagata *et al.*, 1980). No obstante, existen varios factores que aun es necesario mejorar para obtener un mayor rendimiento del producto final puro. La producción de IFN intracelular en *E. coli* presenta inconvenientes como la obtención del producto completamente libre de contaminantes y la presencia de metionina en el extremo N-terminal de la proteína producida.

La obtención de IFN empleando sistemas capaces de secretarlo se ha ensayado en *B. subtilis*, pero los problemas de proteasas en este bacilo han impedido el uso práctico de tal hospedero (Schein *et al.*, 1986). La levadura *S. cerevisiae* ha sido también empleada en la producción de proteínas heterólogas y en particular con sistemas de secreción (Brake *et al.*, 1984).

Es conocido que existen pocas proteínas que son secretadas al medio por la levadura *S. cerevisiae*, entre las que se encuentra el factor *killer* (Bussey, 1972), el factor α de tipo de apareamiento (FAT α) (Julius *et al.*, 1983) y la sacarosa invertasa (Carlson *et al.*, 1983). La señal de secreción del FAT α se ha usado con éxito para producir la secreción

de proteínas heterólogas como el factor de crecimiento epitelial (Brake *et al.*, 1984) y el IFN α -2 (Chang *et al.*, 1986).

Son diferentes las secuencias promotoras que se han empleado para la expresión de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*: FAT (Brake *et al.*, 1984); alcohol deshidrogenasa (Hitzeman *et al.*, 1981); 3-fosfoglicerato quinasa (Derynck *et al.*, 1983); fosfatasa ácida (Miyanochara *et al.*, 1983), y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GFD) (Bitter y Egan, 1984).

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos en la expresión del gen del IFN α -2 acoplado al péptido señal del FAT.

Se ensayó la expresión de esta estructura híbrida bajo el control del promotor del propio FAT α y también bajo el control del fragmento corto del promotor del gen de la GFD.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de microorganismos empleadas

Cepa de bacteria: MC 1066 *E. coli* K-12 hsdR pyrF 74: Tn 5 (Km^r) leu B6 ara⁺ trp C 9830 (lac IPOZYA) X 74, gal U, gal K, str A^r.

Cepa de levadura: *S. cerevisiae* SEY 2202 α leu 2-3, ura 3-52, his 4-519.

Medios de cultivo

Medios de crecimiento para bacterias: las bacterias para la fabricación de células competentes se multiplicaron en medio N, que contiene 10 g/l de triptona, 8 g/l de cloruro de sodio, 1 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de glucosa. Los sólidos contenían 1,5 % de agar técnico #3. El crecimiento para la obtención de plasmidios se realizó en medio Luria-Bertani con ampicilina, a una concentración de 50 mg/l.

Medio de crecimiento de la levadura: el cultivo de la cepa de levadura para la transformación se realizó en medio YPG, que contiene 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona bacteriológica y glucosa al 2%. Las células transformadas se sembraron sobre medio mínimo (GO) (Galzy y Slonimski, 1957). Los constituyentes de los medios provienen de la casa OXOID.

Fabricación de protoplastos

Las células fueron resuspendidas a una DO = 6 en tris HCl, pH = 7,5 25 mM, sorbitol 0,9 M y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con zimolasa de 60 000 U/g, de la firma comercial Kirin Brewery Co. Ltd., Japón, a una concentración de 50 g/ml. Se verificó la formación de protoplastos mediante el ensayo con SDS, y además, observando con el microscopio.

Enzimas utilizadas

Enzimas de restricción: las enzimas de restricción Bam HI, Hind III, Pst I, Sal I, Sau 3-A y Xba I, fueron obtenidas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, siguiendo esencialmente los procedimientos descritos por Wilson y Young, 1980; Smith y Wilcox, 1970; Smith *et al.*, 1976; Robert *et al.*, 1978; Sussenbach *et al.*, 1976, y Robert y Sayeeda, 1977, respectivamente.

Enzimas de modificación: polimerasa I fragmento de Klenow, purificada en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, a partir de un material clonado y según el procedimiento descrito por Joyce y Grindlei, 1983; fosfatasa alcalina de intestino de ternera y nucleasa SI, provenientes de la casa Boehringer; T4 ligasa del Instituto de Microbiología y Fisiología de los Microorganismos de Pushino, URSS.

Técnicas de trabajo con ADN

Las técnicas de purificación de ADN, las digestiones con enzimas de restricción, transformación en bacteria e hibridación de colonias, se realizaron básicamente según lo descrito por Maniatis *et al.*, 1982.

Marcaje de ADN: el marcaje de oligonucleótidos sintéticos y el marcaje de bandas se realizó, en lo fundamental, de acuerdo con la metodología descrita por Valenzuela y Méndez, 1982.

Transformación de levadura: fue realizada según el método reportado por Ito *et al.*, 1983.

Síntesis de oligonucleótidos: se realizó según lo referido por Jiménez *et al.*, 1984. La secuencia de ADN se realizó según Heinrich *et al.*, 1986.

Obtención del gen IFN α -2

El gen del IFN α -2 empleado fue previamente obtenido en nuestro laboratorio. La preparación de ARN a partir de leucocitos inducidos por virus Sendai, aparece descrita por Grillo *et al.*, 1984. La obtención del ADN complementario se efectuó según el procedimiento que se reporta por Goward *et al.*, 1983 y la identificación de los recombinantes se efectuó por hibridación con oligonucleótidos marcados.

El plásmido pJDY 15, que contiene al péptido señal del FAT α con su promotor, el origen de replicación del plasmidio 2 μ , el gen *ura-3*, el origen de replicación del pBR 322 y el gen de resistencia a ampicilina, nos fue suministrado gentilmente por el Dr. E. Scott, de la Universidad de Caltech, California, Estados Unidos de Norteamérica.

La actividad de IFN α -2 fue determinada por inhibición del efecto citopatogénico de virus Mengo en células Hep-2.

RESULTADOS Y DISCUSION

Construcción del plasmidio que contiene el gen IFN α -2 acoplado a la señal de secreción y al promotor FAT α (pyCB 112)

El gen del IFN α -2 fue obtenido de una genoteca de ADNc en pUC-9. El vector se digirió con las enzimas de restricción Hind III y Sal I, obteniéndose un fragmento que contenía al gen del IFN α -2 con la secuencia del péptido señal. Con el propósito de eliminar esto, se realizó una digestión parcial con Sau 3-A, obteniéndose el gen del IFN α -2 sin el codón de la cisteína UGU, que es el primer aminoácido de la proteína madura. El fragmento que contenía el IFN α -2 quedó, por tanto, con el extremo 5' Sau 3-A y el extremo 3' Sal I (figura 1).

El plasmidio pJDY 15 fue digerido con Bam HI y Sal I, y mediante una reacción de ligazón con la enzima T4 ligasa se obtuvo el pyCB 112 (figura 1).

Construcción intermedia para la manipulación del gen del IFN α -2 (pDA8)

Para facilitar la manipulación del gen IFN α -2 y lograr restituirle la cisteína, se realizó una construcción utilizando como vector al pCQV-2 (Queen, 1983) digerido con Bam HI, tratado con polimerasa I fragmento de Klenow y finalmente digerido con Sal I.

Mediante la ligazón de tres elementos, se le acopló a este vector un oligo sintético cuya secuencia se describe en la figura 1, que contiene al codón UGU y que acopla en el extremo 5' con el extremo romo construido en el pCQV-2 y el gen del INF α -2. Finalmente, se obtuvo el plasmidio pDA 8 (figura 1).

En la figura 2 aparece la secuencia correspondiente al extremo 5' del gen del IFN α -2, así como la región correspondiente al oligo adaptador.

Construcción del plasmidio de expresión híbrido GFD-FAT α -INF α -2 (pyCB125, pyCB12g)

El pBR 322 fue digerido con Eco RI y posteriormente tratado con polimerasa I fragmento de Klenow; a este vector se le insertó un linker sintético Bam HI.

Por otra parte se aisló de una genoteca el fragmento corto del promotor del gen de la GFD, similar a como se describe por Bitter y Egan, 1984. El gen del FAT α fue modificado con el objetivo de disponer de la señal de secreción del FAT correcta, es decir, sin la secuencia repetitiva GLU ALA (Brake *et al.*, 1984).

Se hizo, además, una mutagénesis dirigida sobre el plasmidio anterior, con el propósito de crear un sitio Xba I.

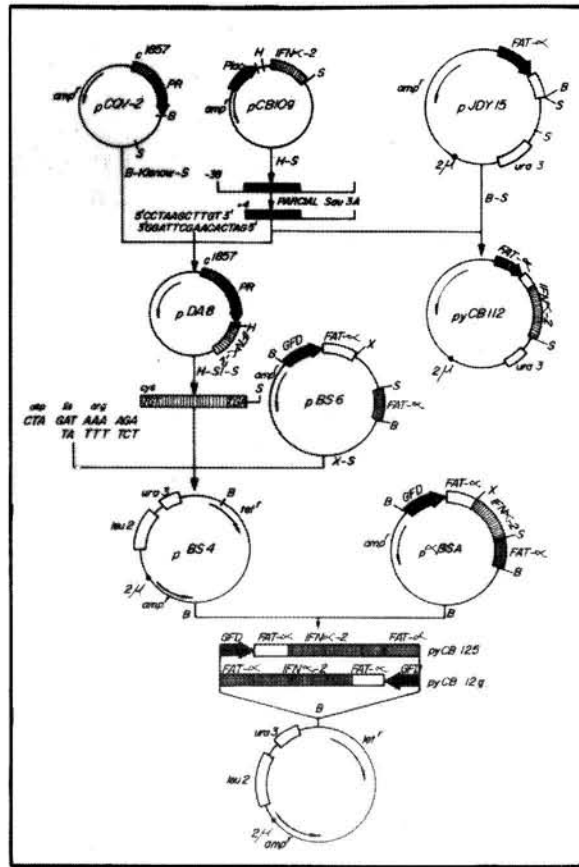
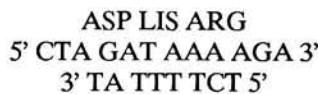


FIG. 1. Construcción de los plasmidios de expresión pyCB 112, 125 y 12g. En la figura se muestra la estrategia seguida en la construcción (ver los detalles en *Resultados*).

Con la manipulación del sitio Pst I del inicio de la región de codificación del péptido señal del FAT α e inserción de un oligo para restituir la región entre este sitio y el inicio del péptido señal, y finalmente su acoplamiento al GFD, se logró la construcción de un sistema híbrido GFD-FAT α (pBS6)

De esta forma, para insertar el gen del IFN α -2 frente a esta señal de secreción, bastó con cortar el plasmidio pBS 6 con la enzima de restricción Xba I y acoplarlo al gen del IFN α -2 obtenido del pDA8 por medio de una digestión con Hind III, tratamiento con nucleasa SI y corte Sal I (figura 1).

Para unir el extremo romo del gen IFN α -2 y el sitio Xba I, se empleó un adaptador con la secuencia siguiente:



que restituye los aminoácidos asparagina, lisina y arginina de la secuencia de corte de la peptidasa (Julius *et al.*, 1983) (pBSA).

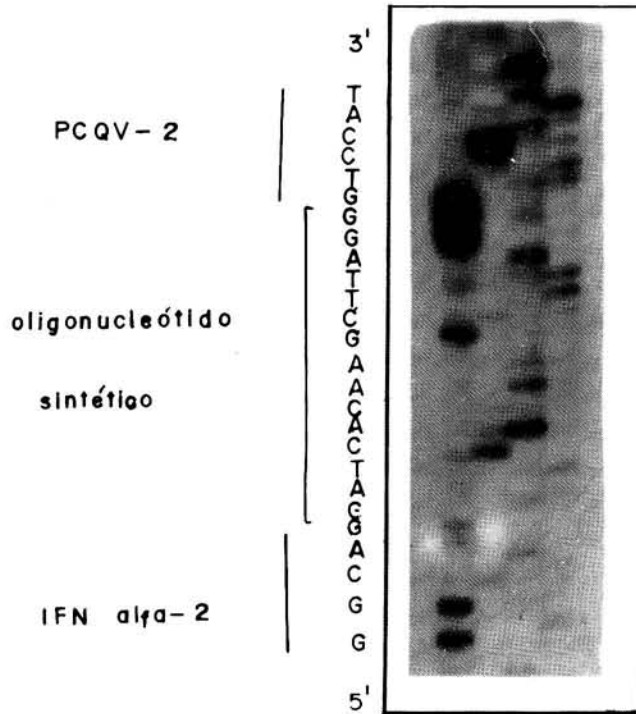


FIG. 2. Secuencia de nucleótidos de la junta entre el gen del IFN α -2 y el plasmidio pCQV-2 en el plasmidio pDAB.

Este fragmento conteniendo el promotor, señal de secreción, gen IFN α -2 y la señal de terminación del FAT α , fue transferido al plasmidio pBS 4 que contenía el origen de replicación plasmidio 2μ , el gen *ura-3*, el gen *leu-2* defectivo, el origen de replicación del pBR 322, el gen de resistencia a ampicilina y la secuencia del promotor del gen de la tetraciclina del pBR 322 (figura 1). Ambas construcciones descritas (pyCB 112 y pyCB 125 o 12g) tienen sistemas similares de replicación y selección en levadura.

Un resultado interesante (tabla 1), aparecido en el análisis de los diferentes clones de la construcción en la cual el gen híbrido FAT α -IFN α -2 queda bajo el promotor GFD, fue que en las levaduras se observaron dos niveles de producción de interferón; uno aproximadamente 30-35 veces superior al otro.

Cuando se analizaron los plasmidios de los cuales provenía cada grupo, se encontró que diferían en cuanto a la orientación del fragmento Bam HI en el plasmidio quimérico de levadura pBS 4. Las levaduras más productoras tenían el fragmento en la orientación en la cual la dirección de la transcripción por el promotor FAT α era contraria a la dirección de la transcripción del promotor de la tetraciclina del pBR 322 (pyCB 12g). El inserto en las bajas productoras estaba dispuesto en forma inversa a las anteriores (pyCB 125). Esto hace pensar en un posible efecto *enhancer* producido por secuencias contenidas en el gen de la tetraciclina.

Al comparar el comportamiento de los niveles de actividad antiviral en el tiempo, en la construcción donde el gen del IFN α -2 se encuentra bajo el promotor del FAT α y del GFD, se observa que hasta las ocho horas el nivel de interferón por unidad de densidad óptica para

el caso del plasmidio pyCB 112 es mayor que en pyBC 12g, y a las 16 horas esa situación se invierte, siendo aún más pronunciada la diferencia a las 36 horas; por otra parte, los niveles de azúcares residuales a las ocho horas están al 50% del valor inicial (20 g/l), y a las 12 horas están prácticamente en cero.

Este resultado sugiere que aún se mantiene cierta represión por glucosa en este fragmento de la región 5' del GFD, lo cual no es congruente con lo reportado por Bitten y Egan (1984), que describen que el fragmento corto del promotor del gen de la GFD no contiene sitios reguladores.

Tabla 1
ACTIVIDAD DE IFN α -2 EN *S. CEREVISIAE**

<i>t</i> (h)		pyCB 112	pyCB 12g	pyCB125
8	UIF/ml	2,3 . 10 ⁵	0,9 . 10 ⁵	-
	UIF/DO	1,0 . 10 ⁵	0,4 . 10 ⁵	-
16	UIF/ml	16 . 10 ⁵	32 . 10 ⁵	1,0 . 10 ⁵
	UIF/DO	3,1 . 10 ⁵	6,1 . 10 ⁵	0,2 . 10 ⁵
36	UIF/ml	4,0 . 10 ⁵	180 . 10 ⁵	-
	UIF/DO	0,4 . 10 ⁵	16 . 10 ⁵	-
2 . 10 ⁸ UIFN ---- 1 mg de proteína				

* Los cultivos se crecieron en erlenmeyers a 30°C, en una zaranda a 240 rpm. El medio de crecimiento fue GO, con hidrolizado de caseína al 1%. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó la actividad de IFN α -2 en el sobrenadante del cultivo.

Como puede apreciarse en la tabla 1, los niveles de IFN α -2 con esta nueva construcción llegan a ser de hasta 10⁵ UIF/ml, considerando para el INF α -2 una actividad de 2 . 10⁸ UIF/mg, podemos estimar que el IFN α -2 producido por esta levadura equivale a aproximadamente el 8% de la proteína total del cultivo. Se midió la actividad de IFN α -2 dentro de la célula entera y en los protoplastos, con el objetivo de estudiar la eficiencia de la señal de secreción del FAT α (tabla 2).

Del análisis de estos valores puede concluirse que no existe una acumulación de IFN α -2 dentro de la célula, luego el sistema de secreción es suficientemente eficiente para no permitir la acumulación de proteínas en el interior, lo cual es de gran utilidad, especialmente para proteínas que puedan ser tóxicas o dañinas para la célula.

En el caso de la construcción del GFD, hay resultados que apuntan a favor de que el material está glicosilado, y actualmente se realizan experimentos para esclarecer este aspecto.

Tabla 2
SECRETION DEL IFN α POR LA S. CEREVISIAE*

<i>t</i> (h)		Células intactas	Periplasma	Sobrenadante
8	UIF/ml	2,40 . 10 ⁵	1,80 . 10 ⁵	1,10 . 10 ⁵
12	UIF/ml	4,80 . 10 ⁵	3,60 . 10 ⁵	1,70 . 10 ⁶
16	UIF/ml	1,10 . 10 ⁶	9,40 . 10 ⁵	8,00 . 10 ⁶
22	UIF/ml	1,80 . 10 ⁶	1,70 . 10 ⁶	4,20 . 10 ⁶

* Las células fueron crecidas en un fermentador de cuatro litros, volumen efectivo, en medio GO con hidrolizado de caseína al 2%. Alicuotas de la suspensión fueron tomadas a distintos tiempos y se determinó actividad de IFN α -2 en células intactas, periplasma y sobrenadante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a A.Seralena su colaboración en la confección de las figuras.

REFERENCIAS

- BITTER, G. A. y K. M. EGAN (1984). *Expresión de heterologous genes in S. cerevisiae from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter*. Gene 32: 263-274.
- BRAKE, A. J.; J. P. MERRYWEATHER; D. G. COIT; U. A. HEBERLEIN; F. R. MASIARZ; G. T. MULLENBACH; M. S. URDEA; P. VALENZUELA y P. J. BARR (1984). *Factor-directed synthesis and secretion of mature foreing proteins in Saaccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 4642-4646.
- BUSEY, H. (1972). *Effects of yeast killer factor on sensitive cells*. Nature New Biology 235: 73-75.
- CARLSON, M.; R. TAUSSIG; S. KUSTU y D. BOTSTEIN (1983). *The Secreted Form of Invertase in Saccharomyces cerevisiae is Synthesized from mRNA Encoding a Signal Sequence*. Molecular and Cellular Biology 3: 439-447.
- CHANG, C. N.; M. MATTEUCCI; L. J. PERRY; J. J. WULF; C. Y. CHEN y R. A. HITZEMAN (1986). *Saccharomyces cerevisiae Secretes and Correctly Processes Human Interferon Hybrid Proteins Containing Yeast Invertase Signal Peptides*. Molecular and Cellular Biology 6: 1812-1819.
- DERYNCK, R.; A. SINGH y D. V. GOEDDEL (1983). *Expression of the human interferon-cDNA in yeast*. Nucleic Acids Research 11: 1819-1837.
- GALZY, P. y P. P. SLONIMSKI (1957). *Variation physiologique de la levure au course de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone*. Comptes. Rend. Acad. Sci. (París) 245: 2423.
- GOWARD, J. M.; D. KAPUT; S. R. WILLIAMS y D. W. MARTIN Jr. (1983). *Cloning of human purine-nucleoside-phosphorilase cDNA sequences by complementation in E. coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80: 4281-4285.
- GRILLO, J. M.; A. SILVA; L. I. NOVOA; O. GARCIA y L. HERRERA (1984). *Empleo de filtración en gel tipo Sephacryl para la purificación de ARNm IFN leucocitario*. Interferón y Biotecnología 1: 41-50.
- HEINRICH, P. (1986). *Guidelines for quick and simple plasmid sequencing*. Boehringer Mannheim BmbH, Biochemica.
- ITO, H.; Y. FUKUDA; K. MURATA y A. KAMURA (1983). *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations*. Journal of Bacteriology 153: 163-168.
- JIMENEZ, V.; G. PADRON; L. CASTELLANOS y L. RODES (1984). *Síntesis química de oligonucleótidos por el método del fosforiéster*. Interferón y Biotecnología 1: 39- 51.
- JOYCE, M. y F. GRINDLEI (1983). *Construction of plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klemow fragment) of DNA Polimerase I of E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1830-1834.

- MANIATIS, T.; E. F. FRISCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- MIYANOHARA, A.; A. TOHE; CH. NOZAKI; F. HAMADA; N. OHTOMO y K. MATSUBARA (1983). *Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 1-5.
- NAGATA, S.; H. TAIRA; A. HALL; L. JOHNSRUD; M. STRENH; J. ECSODI; W. BOLL; K. CANTELL y C. WEISSMANN (1980). *Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity*. Nature **284**: 316-320.
- QUEEN, C. (1983). *A Vector That Uses Phage Signals for Efficient Synthesis of Proteins in Escherichia coli*. Journal of Molecular and Applied Genetics **2**: 1-10.
- ROBERT, R. J. y B. SAYEEDA (1977). *A new specific endonuclease from Xanthomonas badrii*. Journal of Molecular Biology **115**: 249-255.
- ROBERT, R. J.; J. R. ARRAUD y PH. A. MYER (1978). *A new restriction endonuclease from Streptomyces albus G*. Journal of Molecular Biology **118**: 127-135.
- SCHEIN, C. H.; K. KASHIWAGI; A. FUJISAWA y CH. WEISSMANN (1986). *Secretion of mature INF α -2 and accumulation of uncleaved precursor by Bacillus subtilis transformed with a hybrid amylase signal sequence. INF α -2 gene*. Biotechnology **4**: 719-725.
- SMITH, D. I; R. BLATTNER y J. DAVIS (1976). *The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from Providencia stuartii*. Nucleic Acids Research **3**: 343-350.
- SMITH, O. y W. WILCOX (1970). *A restriction enzyme from Haemophilus influenzae. Purification and general properties*. Journal of Molecular Biology **51**: 379-391.
- SUSSENBACH, J.; CH. MONFOORT; R. SCHIPHOF y E. STOBBERING (1976). *A restriction endonuclease from Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Research **3**: 3193-3201.
- VALENZUELA, P. y B. MENDEZ (1982). *Techniques in Molecular Biology*. San Francisco.
- WILSON, G. A. y F. E. YOUNG (1980). *Purification and properties of the Bam HI endonuclease*. Methods in Enzymology **65**: 147-152.