

## Artículos originales completos

### La fusión de los genes superóxido dismutasa humana y la proquimosina de ternero se expresa eficientemente en *Saccharomyces cerevisiae*

I. TORRENS,<sup>1</sup> A. VILLEGAS,<sup>2</sup> R. NARCIANDI,<sup>3</sup> A. SANTOS,<sup>1</sup> E. RODRÍGUEZ,<sup>3</sup> J. MORALES,<sup>1</sup> A. SILVA<sup>1</sup> y L. HERRERA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agrupación de Proteínas y Hormonas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética de Camagüey, Cuba

<sup>3</sup> Agrupación de Planta Piloto, CIGB

Recibido en noviembre de 1989

Aprobado en mayo de 1990

#### RESUMEN

El gen de la proquimosina de ternero (PQ) fue fusionado a la secuencia que codifica los primeros 41 aminoácidos de la superóxido dismutasa humana (SODh). Esta fusión se expresó en la levadura *S. cerevisiae* bajo el control del fragmento corto del promotor que regula la síntesis de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GFD) en este microorganismo. Los niveles de expresión de la proteína fusionada están en el orden del 2% con respecto a la proteína total, produciéndose en forma insoluble y asociada a la membrana. El producto obtenido después de su activación presentó las mismas propiedades biológicas que la enzima natural.

#### SUMMARY

The calf prochymosin gene (PC) was fused to the nucleotide sequence coding for the first 41 N-terminal amino acids from human Superoxide dismutase (hSOD). This protein fusion was expressed on the yeast *S. cerevisiae*. The short fragment of glyceraldehyde-3-phosphate promoter was used to direct the synthesis of the protein. The product was obtained on the insoluble cell-fraction and showed to be membrane associated. The expression level raised up to 2 percent of the total percent protein. After activation procedures, the product showed the same biological activity when compared with the calf chymosin.

#### INTRODUCCION

La quimosina (renina) es una proteasa aspártica cuya actividad específica es inducir la coagulación de la leche (Kaye *et al.*, 1978), por lo que se considera una enzima muy importante en los procesos de producción de quesos.

Recientemente en nuestro laboratorio fue realizada la clonación y expresión de la proquimosina en *E. coli* (Grillo *et al.*, 1989), sin embargo la levadura se ha convertido en el hospedero ideal para la producción de proteínas involucradas en la fabricación de alimentos, pues es un constituyente común de muchos productos alimenticios.

No obstante, la producción de proteínas heterólogas en levaduras se ha visto afectada, en algunos casos, por su inestabilidad en dicho hospedero, por lo que la fusión de proteínas ha resultado ser una alternativa adecuada para resolver estos problemas (Stepien *et al.*, 1983 y Cousen *et al.*, 1987).

En el presente trabajo se discuten los resultados de la expresión del gen de la proquimosina de ternero fusionado a un fragmento que codifica los primeros 41 a.a.

de la porción N-terminal de la SODh, de gran estabilidad en *S. cerevisiae* (Hallewell et al., 1987).

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas de microorganismos empleadas

Bacteria: MC1066 *E. coli* K-12 hsdR pyrF74:Tn5(km<sup>r</sup>) leu B6 ara<sup>+</sup> trp C 9830 (lac IPOZYA)x74,galU,galK, strA<sup>r</sup>.

Levaduras:

*S. cerevisiae* SEY 2202 alfa leu 2-3,ura 3-52,his 4-519.

*S. cerevisiae* Alfa pep 4-3,prb 1-1122,leu 2,ura 3, trp 1.

*S. cerevisiae* SJRYa,ura 3,leu 2,his 4.

*S. cerevisiae* CGY78,alfa ura 3-34.

*S. cerevisiae* CGY127,alfa ura 3-52.

### Medios de cultivo

LB: Triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cloruro de sodio 10 g/l.

YPG: Extracto de levadura 10 g/l, peptona bacteriológica 20 g/l, suplementado con glucosa 20 g/l.

YPS: YP suplementado con sacarosa 20 g/l.

GO: Como describe Sherman et al., 1982, suplementado con hidrolizado de caseína al 1% y glucosa al 2%.

### Enzimas de restricción y modificación

Enzimas XbaI, Sall, ClaI, BamHI, Klenow y T4 ligasa, producidas por Enzibiot, PNK y fosfatasa alcalina de ternero por Boehringer, y StuI por Biolabs. Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por las casas comerciales respectivas.

### Síntesis de oligonucleótidos

Se realizó según lo referido por Jiménez et al., 1984.

### Técnicas de ADN recombinante

Se hicieron según Maniatis et al., 1982.

### Construcción del plasmidio que contiene la fusión SODh-PQ (pTT10)

El plasmidio pBR7 (Grillo et al., resultados no publicados), que contiene el gen de la SODh fusionado a las señales de promoción y terminación del gen GFD, fue digerido por un sitio StuI que se encuentra a 125 pb del inicio de la traducción del gen de la SODh, al cual se le insertó un linker sintético XbaI y finalmente fue digerido Sall.

Del plasmidio pBQ6 (Grillo et al., resultados no publicados), se aisló un fragmento que contiene el gen de la PQ fusionado en su extremo 5' a una secuencia de 12 pb que codifica para los cuatro últimos aminoácidos (leu-asp-lys-arg) del extremo carboxilo del factor de apareamiento de tipo alfa (FAT ALPHA) y en su extremo 3' a la secuencia del terminador de la transcripción del gen GFD. La unión de este fragmento con el vector del plasmidio pBR 7 dio lugar al plasmidio pTT10 (figura 1), el cual respondió a la estructura esperada, lo que se verificó por análisis de restricción y secuencia de ADN (resultados no mostrados).

### Construcción del plasmidio para expresión en levaduras (pYQ10,57,60,71)

El plasmidio pTT10 digerido con ClaI,Sall y tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, liberó el fragmento que contiene la versión corta del promotor del gen GFD (Bitter y Egan, 1984) unido a la fusión SODh-FAT ALPHA-PQ y la señal de terminación de la transcripción del gen GFD. Este fragmento fue transferido en las dos orientaciones posibles al plasmidio pBS4 que contiene los orígenes de replicación de los plasmidios 2 $\mu$  y pBR322, los genes  $\beta$  lactamasa, ura3 y leu2 defectivo, y la secuencia del gen de la tetraciclina del pBR322 a partir del sitio BamHI.

### Transformación de levadura

Fue realizada según el método reportado por Ito et al. (1983), utilizando uracilo como marcador de auxotrofia.

### Condiciones de inducción de la expresión de la fusión SODh-PQ en levadura

Las células de levadura transformadas fueron inicialmente crecidas con agitación en medio GO suplementado (ver Materiales y Métodos) a 30°C hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en que el cultivo se lavó y resuspendió en medio YPS para ser incubado 23 h a 30°C con agitación.

### Preparación de extractos celulares

Aproximadamente 10<sup>9</sup> células fueron resuspendidas en 0,3 ml de solución de ruptura (Tris HCL 0,1 M pH 7,9, sacarosa 10%, NaCl 0,3 M y EDTA 5 mM) añadiéndosele 0,3 g de perlas de vidrio según la técnica descrita por Rose et al., 1981. Posterior a la ruptura se procedió a una centrifugación a 12 000 xg durante 5 minutos, a temperatura ambiente, y se separó el sobrenadante del debris celular.

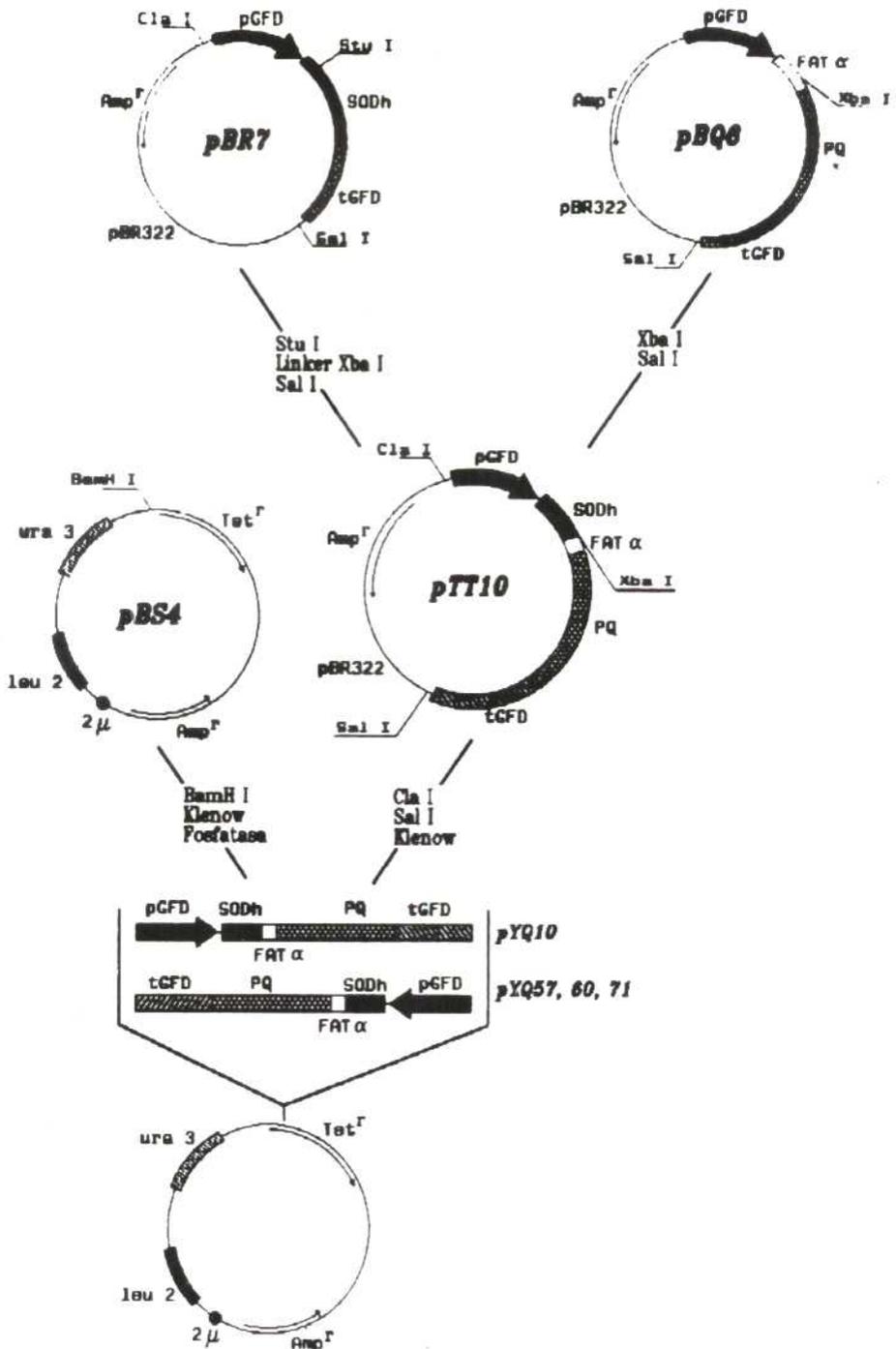


FIG. 1. Construcción de los plasmidios de expresión pYQ10, 57,60,71; estrategia seguida en la construcción. Linker utilizado: 5' TGCTCTAGAGCA 3' (ver detalles en el texto).

### Ensayo de coagulación de la leche

La proteína fusionada fue extraída de la membrana y renaturalizada según lo recomendado por Narciandi (manuscrito en preparación). Esta fue activada por acidificación a pH 2 con 1 N HCl y neutralizada a pH 6,3 con 1 N NaOH. La actividad de coagulación de la leche fue realizada según lo descrito por Emtage *et al.*, 1983.

### Western blot

El western blot se realizó según Towbin *et al.*, 1979 y Burnett *et al.*, 1981.

### Inmunodot

El Inmunodot fue realizado según lo descrito por Gershoni *et al.*, 1983.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Expresión de la fusión SODh-PQ en las células de levadura

La levadura SEY 2202 transformada con el plasmidio pYQ60 fue crecida en medio GO suplementado, e inducida en medio YPS, según se describe en Materiales y Métodos. Igual número de células de la fase inicial del cultivo, como de la inducción,

fueron analizadas en un western blot, utilizando un anticuerpo policlonal antiquimosina obtenido en nuestro laboratorio.

Los niveles de expresión que se obtuvieron en las células inducidas fueron de alrededor del 2% de la proteína total, no detectándose producción alguna de la proteína fusionada en células sin inducir, lo cual demostró que nuestro sistema respondía a la regulación del promotor utilizado (figura 2).

La proteína híbrida migró con un peso molecular aproximado de 46 kDa, mayor que la proquimosina (41 kDa), lo que coincide con los cálculos realizados a partir del peso molecular de la PQ más 41 a.a. de la SODh.

### Influencia de la orientación del fragmento SODh-PQ en la expresión de la proteína fusionada

La cepa de levadura SEY 2202 fue transformada con los plasmidios pYQ10,57,60,71 y también con el plasmidio pBS4 como control negativo de la expresión.

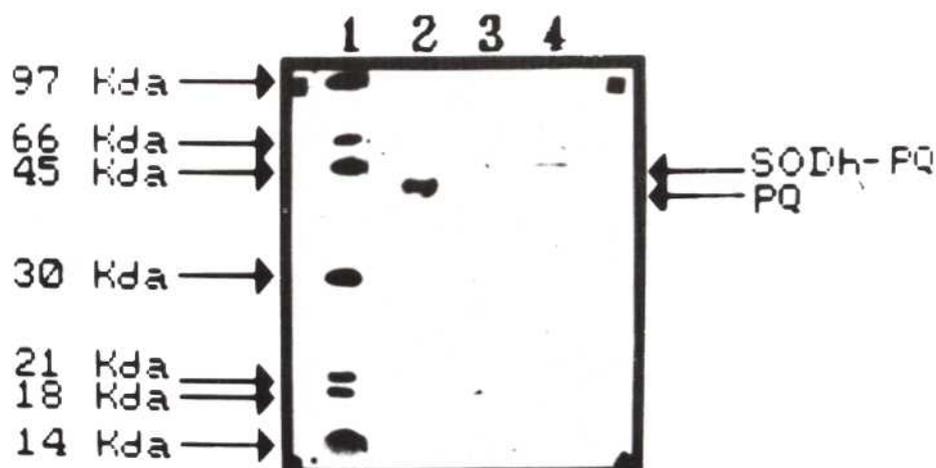


FIG. 2. Expresión de la fusión SOD-PQ en las células de levadura. Autorradiograma del western blot: 1) Patrón de pesos moleculares; 2) Proquimosina purificada de *E. coli* (2  $\mu$ g); 3) Células antes de inducir (10  $\mu$ g de proteína total); 4) Células después de inducir (10  $\mu$ g de proteína total).

Todos los transformantes fueron crecidos e inducidos en las mismas condiciones (ver Materiales y Métodos) y analizados por western blot. Las células transformadas con los plasmidios PYQ57,60,71 mostraron un mayor nivel de expresión de la proteína fusionada que las transformadas con el plasmidio pYQ10, cuyo inserto se encuentra orientado en forma inversa (figuras 1 y 3).

Estos resultados coinciden con los reportados por De la Fuente *et al.*, 1988, para el interferón  $\alpha$ -2 recombinante expresado en *S. cerevisiae*. Una posible explicación para este resultado es que en el gen de la tetraciclina estén contenidas algunas regiones que puedan funcionar como secuencias de activación de la transcripción en levadura, conocidas como UAS, las cuales influyen en los niveles de transcripción de sus genes próximos.

### Comparación de los niveles de expresión de la proteína fusionada en diferentes cepas de *S. cerevisiae*

Diferentes cepas de levadura transformadas con el plasmidio pYQ60 fueron crecidas e inducidas, en las mismas condiciones que se describen en Materiales y Métodos. Muestras tomadas al mismo tiempo fueron analizadas por Inmunodot, utilizando el anticuerpo policlonal antiquimosina.

Como se muestra en la figura 4, no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de la proteína fusionada en las cepas de levadura utilizadas, lo cual puede ser el resultado de una mayor estabilidad de esta fusión, posiblemente proporcionada por el fragmento N-terminal de la SODh utilizado en esta fusión.

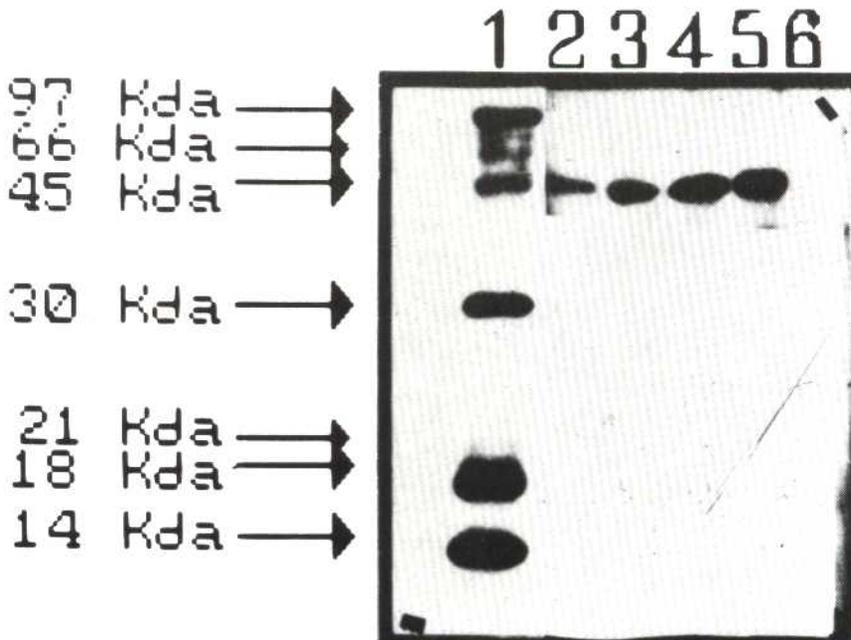


FIG. 3. Influencia de la orientación del fragmento SODh-PQ en la expresión de la proteína fusionada. Autorradiograma del western blot: 1) Patrón de pesos moleculares; 2) pYQ10; 3) pYQ57; 4) pYQ60; 5) pYQ71; 6) pBS4.

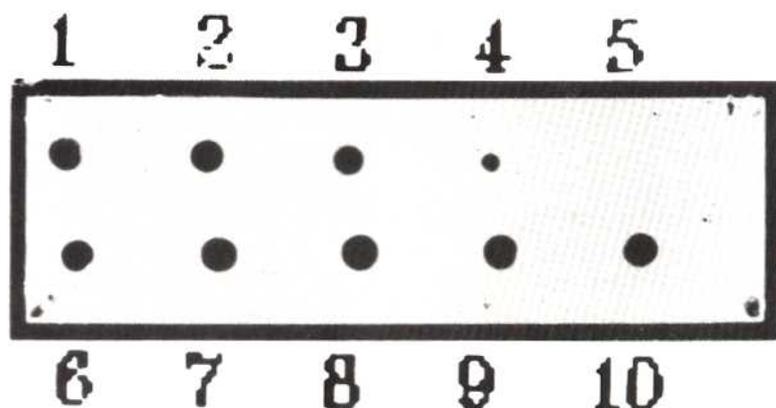


FIG. 4. Comparación de los niveles de expresión de la proteína fusionada. Autorradiograma del Inmunodot: 1, 2, 3, 4 y 5) Quimosina comercial (5  $\mu$ g; 2  $\mu$ g; 0,5  $\mu$ g; 0,2  $\mu$ g respectivamente); 6) Alfa pep 4-3); 7) SY 2202; 8) SJRYa; 9) CGY78; 10) CGY127.

### Solubilidad de la fusión SODh-PQ en el hospedero

Con el objetivo de determinar la solubilidad de la fusión SODh-PQ en las células de levadura, las fracciones solubles y del

debris celular, obtenidas como resultado del rompimiento, fueron analizadas por western blot. La figura 5 evidencia que la SODh-PQ en esta construcción es expresada de forma insoluble al solo hallarse asociada al debris celular.

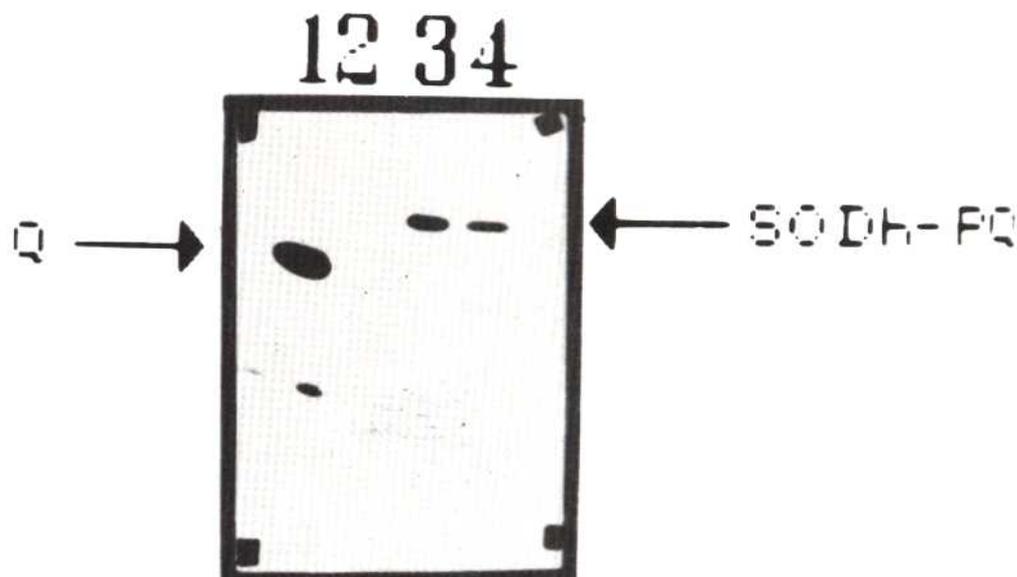


FIG. 5. Solubilidad de la fusión SODh-PQ en el hospedero. Autorradiograma del western blot: 1) Quimosina comercial; 2) Fracción soluble; 3) Debris celular; 4) Células intactas.

## Procesamiento de la fusión SODh-PQ sintetizada en levadura

Con el objetivo de comprobar la actividad coagulante de la SODh-PQ, fue necesario primeramente realizar la extracción de la proteína fusionada, la cual se encontraba asociada al debris celular. La extracción se realizó con urea 8 M a pH 10,5 lo cual permitió solubilizar el 90% de la proteína (figura 6), seguido de un proceso de renaturalización que consistió en diluir la urea a 0,4 M.

Como puede observarse en la figura 6, después del proceso de renaturalización la proteína migró con un peso molecular menor, entre 46 y 35 kDa. Esto nos hizo pensar en un posible procesamiento *in vitro* del híbrido SODh-PQ, como resultado de la ruptura química de algún enlace peptídico o de la hidrólisis enzimática catalizada por alguna endopeptidasa propia de *S. cerevisiae*, que pudiera haber sido extraída durante la solubilización y actuado

en algún momento del proceso de renaturalización.

Ha sido reportado que la endopeptidasa KEX 2 de *S. cerevisiae* hidroliza por el extremo carboxilo del residuo dibásico Lys-Arg (Julius *et al.*, 1984). Esta secuencia está contenida en los 4 a.a. de FAT ALPHA presentes en nuestra construcción, por lo que es posible que la fusión haya sido procesada por esta endopeptidasa.

Si esta fuera la causa del procesamiento, podría ser factible utilizar las posibilidades de este sistema para expresar en *S. cerevisiae* proteínas fusionadas que presenten problemas de inestabilidad, fusionándose a la porción de la SODh más los 4 a.a. de FAT ALPHA utilizados por nosotros, con vistas a estabilizar la producción de la proteína de interés y contar, al mismo tiempo, con una vía de procesamiento que permita posteriormente separar esta proteína de la porción estabilizadora. Actualmente, se llevan a cabo experimentos para corroborar dicha hipótesis.

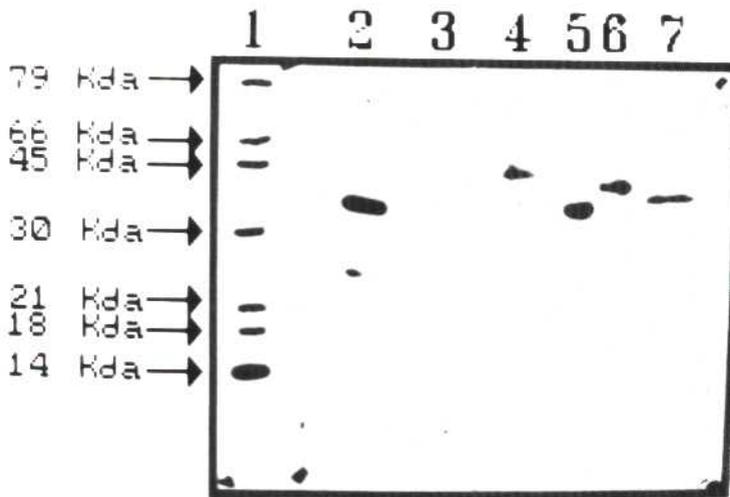


FIG. 6. Procesamiento de la fusión SODh-PQ sintetizada en levadura. Autorradiograma del western blot: 1) Patrón de pesos moleculares; 2) Quimosina comercial; 3) Fracción insoluble; 4) Fracción soluble; 5) Quimosina comercial; 6) Fracción después de la renaturalización; 7) Fracción después de la activación.

La proteína, después de la activación, migró al nivel de la quimosina con un peso molecular de 35 kDa (figura 6) y mostró poseer idéntica actividad biológica que la enzima natural.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a R. Ortega y a R. Rubiera su colaboración en la confección de las figuras, y a A. Seralena su colaboración en la escritura del manuscrito.

## REFERENCIAS

- BITTER, G. A. y K. M. EGAN (1984). Expression of heterologous genes *S. cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Gene* 32: 263-274.
- BURNETT, N. N. (1981). Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochemistry* 112: 195-203.
- COUSENS, L. S.; J. R. SHUSTER; C. GALLEGOS; M. M. STEMPIEN; M. S. URDEA; R. S. PASCADOR; A. TAYLOR y P. T. OLSON (1987). High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 61: 265-275.
- DE LA FUENTE, J.; A. HERRERA; A. SILVA; S. PEREZ; M. QUINTANA; J. DELGADO; J. FERNANDEZ y L. HERRERA (1988). Expresión y secreción del interferón alfa 2 recombinante por la levadura *S. cerevisiae*. *Interferón y Biotecnología* 2: 125-132.
- EMTAGE, J. S.; S. ANGAL; M. T. DOEL; T. J. R. HARRIS; B. JENKINS; G. LILLEY y P. A. LOWE (1983). Synthesis of calf prochymosine (Prorenin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3671-3675.
- GERSHONI, J. M. y G. E. PALADE (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131: 1-15.
- GRILLO, J. M.; V. MUSIO; I. TORRENS; V. JIMENEZ; A. SILVA; A. SANTOS; Y. QUIÑONES; R. NARCIANDI y L. HERRERA (1989). Expresión del gen de la quimosina en *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* 6: 244-250.
- HALLEWELL, R.A.; R. MILLS; P. TEKAMP OLSON; R. BLACHER; S. ROSEMBERG; F. OTTING; F. R. MASIARZ y C. S. SCANELLA (1987). Amino terminal acetylation of authentic human Cu, Zn superoxide dismutase. *Biotechnology* 5: 363-366.
- ITO, H.; Y. FUKUDA; K. MURATA y A. KAMURA (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkalications. *Journal of Bacteriology* 153: 163-168.
- JIMENEZ, V.; G. PADRON; L. CASTELLANOS y L. RODES (1984). Síntesis química de oligonucleótidos por el método del fosfodiéster. *Interferón y Biotecnología* 1: 39-51.
- JULIUS, D.; A. BRAKE; L. BLAIR; R. KUNISAWA y J. THORNER (1984). Isolation of the putative structural gene for the lys-arg-cleavage endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37: 1075-1089.
- KAYE, N. M. C. y P. JOLLES (1978). The involvement of one of the three histidine residues of cow k-casein in the chymosin-initiated milk clotting process. *Biochem. Biophys. Acta* 536: 329-340.
- MANIATIS, T.; E. F. FRISCH y J. SAMBROOK (1982). Molecular cloning. *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- ROSE, M.; M. J. CASADABAN y D. BOTSTEIN (1981). Yeast genes fused to beta-galactosidase in *Escherichia coli* can be expressed normally in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2460-2464.
- SANGER, F.; S. NICKLEN y A. R. COULON (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SHERMAN, F.; G. R. FINK y J. B. HICKS (1982). "Synthetic complete medium". En: *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p. 62.
- STEMPIEN, P. P.; R. BROUSSEAW; R. WU; S. NARANG y D. Y. THOMAS (1983). Synthesis of a human insulin gene. VI. Expression of the synthetic proinsulin gene in yeast. *Gene* 24: 289-297.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN y J. GORDON (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.