

## Alto nivel de secreción de una enzima alfa amilasa bacteriana en la levadura *Pichia pastoris*

E. MARGOLLES, E. PAIFER y J. DELGADO

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en julio de 1991

Aprobado en octubre de 1991

### RESUMEN

En este trabajo se presenta la clonación y expresión en *P. pastoris* de un gen codificante de la enzima alfa amilasa. El gen alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25 con su propia secuencia señal, se puso bajo el control del promotor AOX1 (alcohol oxidasa 1) de *P. pastoris* en una construcción integrativa, la cual se integra con alta frecuencia en el locus AOX1 mediante recombinación homóloga por desplazamiento. Se observó que la secuencia señal de este gen funciona en esta levadura, pues en cultivos de la levadura transformada, después de inducida la expresión con metanol, fueron obtenidos altos niveles de la enzima secretada al medio de cultivo, llegándose a producir alrededor de 0,9 g/l. La alfa amilasa apareció con un alto grado de N-glicosilación propia de proteínas extracelulares.

### SUMMARY

A *Bacillus licheniformis* alpha amylase gene has been cloned and expressed in *Pichia pastoris*. The alpha amylase gene from *B. licheniformis* CIB-25 with its own signal sequence was cloned under the control of AOX1 promoter (Alcohol Oxidase 1) from *P. pastoris* using an integrative construction, this was integrated with high frequency at the AOX1 locus by gene replacement homologous recombination. The function of the alpha amylase signal sequence was observed due to the high amount of enzyme obtained in the cultural medium after the induction of expression in transformed yeast by using methanol, producing around 0.9 g/l. The alpha amylase appeared with a high N-glycosylation level typical of extracellular proteins.

### INTRODUCCION

En los últimos años ha sido desarrollado un sistema de expresión basado en la levadura metilotrófica *P. pastoris*, la cual es capaz de producir altos niveles de proteínas (hasta 30%) en células que crecen en metanol como única fuente de carbono y energía (Cregg *et al.*, 1985; Tschopp *et al.*, 1987).

Entre las ventajas que se reportan para este sistema aparecen: la capacidad de secretar hasta más del 90% de las proteínas heterólogas al medio de cultivo, la secreción, en pocas cantidades, de sus proteínas nativas, la glicosilación en menor grado de las proteínas expresadas en comparación con *S. cerevisiae* (uno de los hospederos más utilizados) y la factibilidad de escalado y producción hasta densidades tan altas como 130 g/l (masa seca).

Aprovechando estas ventajas, la levadura metilotrófica *P. pastoris* ha sido utilizada eficientemente para la producción de elevados niveles de proteínas recombinantes de interés biotecnológico como invertasa,  $\beta$ -galactosidasa y antígeno de superficie contra la hepatitis B, usando para esto

el promotor AOX1 como regulador de la expresión del gen (Tschopp *et al.*, 1987; Cregg *et al.*, 1987).

Recientemente en nuestro laboratorio se aisló una cepa mutante auxotrófica *his*<sup>-</sup> a partir de la levadura salvaje de *P. pastoris* con características culturales semejantes a la cepa parental. Al comprobarse que esta mutación complementa con el gen HIS3 de *S. cerevisiae*, se desarrolló un sistema eficiente de transformación (Young *et al.*, 1992). En trabajos previos fue clonado el gen AOX1 de esta levadura y la región promotora se utilizó para expresar el gen SUC2 de *S. cerevisiae* en la levadura metilotrófica *H. polymorpha*, obteniéndose altos niveles de esta enzima en condiciones de inducción con metanol (Rodríguez *et al.*, 1991). Estas premisas dieron la posibilidad de utilizar este sistema para la expresión de genes heterólogos de manera atractiva.

Para lograr la obtención de una cepa de levadura recombinante de *P. pastoris* capaz de expresar altos niveles de una enzima alfa amilasa, se construyó un vector integrativo conteniendo el gen alfa amilasa de la cepa de *B. licheniformis* CIB-25 con su secuencia señal y regulado por el promotor AOX1 de *P. pastoris*. Una cepa de *P. pastoris* transformada con este plasmidio se utilizó para evaluar la síntesis y secreción de la forma madura de alfa amilasa y su nivel de glicosilación.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas y medios

La cepa de *B. licheniformis* CIB-25 utilizada para aislar el gen alfa amilasa se creció en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) a 37°C. La cepa MC 1066 (F,D lacX74, hsr, hsm, rps1, galU, galK, tripC 9030F, leuB 600,

pyrF::tn5) se utilizó para transformar y multiplicar todas las construcciones génicas de este trabajo. Esta se creció a 37°C en medio LB y se añadió, según el caso, ampicilina a 100  $\mu$ g/ml o tetraciclina a 15  $\mu$ g/ml. La cepa de levadura *P. pastoris* MP36 mutante *his*<sup>-</sup> (Yong *et al.*, 1992) y la cepa salvaje se multiplicaron en medio YPG (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l y glucosa 20 g/l). La cepa de levadura transformada se creció en medio G como medio de selección (Galzy y Slonimski, 1957).

### Aislamiento de ADN cromosomal

El ADN de *B. licheniformis* CIB-25 se aisló usando el método de Dubnau y Davidoff-Abelson (1971). El ADN de la levadura *P. pastoris* se aisló según Cregg *et al.* (1985).

### Transformación

Las cepas de *E. coli*, se transformaron por el método de permeabilización con CaCl<sub>2</sub> descrito por Maniatis *et al.* (1982).

El método de transformación utilizado para la cepa de levadura MP36 fue descrito por Cregg *et al.* (1985) y se realizaron algunas modificaciones en nuestro laboratorio (Yong *et al.*, 1992).

### Construcción de genoteca

La genoteca parcial se realizó digiriendo con la enzima EcoRI el ADN del *B. licheniformis* CIB-25. Los fragmentos de talla entre 2 y 4 kb se aislaron mediante electroforesis de agarosa de bajo punto de fusión (LGT) seguido por electroelución. Estos fragmentos se ligaron al vector pBR322 digerido con EcoRI y tratado con fosfatasa alcalina (CIP). La ligazón se transformó en la cepa MC 1066.

### Reacción en cadena de la polimerasa

Tomando como referencia la secuencia del gen alfa amilasa de *B. licheniformis* NCIB 8016 publicada por Gray *et al.* (1986) se diseñaron dos oligonucleótidos sintéticos

para realizar una reacción en cadena de la polimerasa. La secuencia de ambos oligos se muestra en la figura 1. La amplificación del gen aislado se realizó según el procedimiento descrito por Salki *et al.* (1988) para la enzima Taq polimerasa.

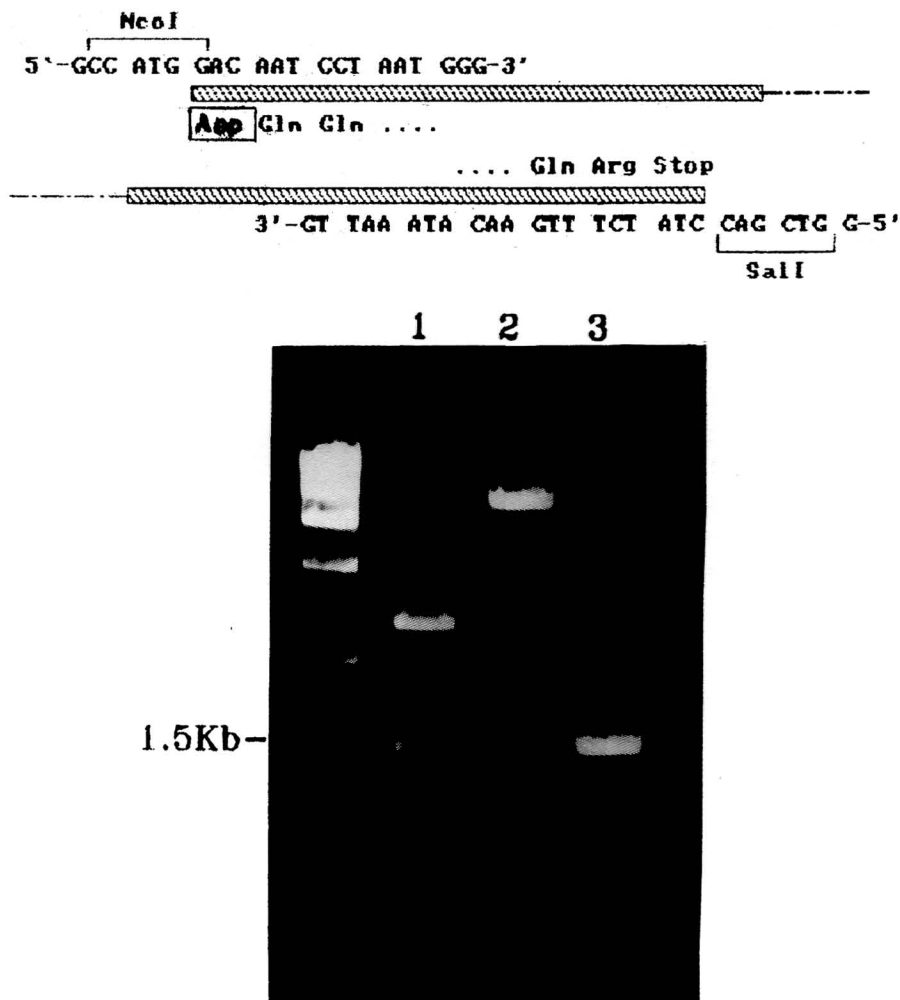


FIG. 1. Amplificación del gen de alfa amilasa mediante PCR. En (A) se muestra el diseño de oligonucleótidos para amplificar la región del gen estructural y su secuencia señal a partir del plasmidio pAB-24. En la figura aparecen los sitios de restricción creados. La posición de la Asp encerrada en un cuadro corresponde a la Lys (AAA) reportada en la secuencia original del *B. licheniformis* NCIB 8016. (B) corresponde a la electroforesis en gel de agarosa del producto del PCR. Línea 1) pBR322 digerido con PvuII/SphI y usado como control el fragmento de 1.5 kb de tamaño. Línea 2) pAB-24 digerido con BamHI. Línea 3, banda amplificada en la reacción en cadena de la polimerasa, el patrón de pesos moleculares ( $\lambda$  HindIII) aparece a la izquierda en la figura.

### Southern-blot

El *Southern-blot* se realizó según describe Maniatis *et al.* (1982)

### Detección y ensayo de actividad alfa amilasa

En experimentos de selección de los clones de bacterias con actividad alfa amilasa, las colonias fueron crecidas sobre medio LB con tetraciclina y suplementado con almidón al 0,5%. Después de tres días de incubación a 37°C, las placas fueron teñidas con vapores de yodo buscando la aparición de halos claros alrededor de las colonias como criterio de actividad alfa amilasa.

Para la selección de levaduras transformantes con actividad alfa amilasa, las colonias previamente crecidas en medio de selección se parcharon sobre medio sólido G suplementado con histidina y conteniendo 0,5% de almidón. La placa se mantuvo en atmósfera de metanol para inducir la expresión. Las placas se incubaron a 30°C durante tres días y fueron teñidas de la misma forma descrita anteriormente.

En extractos enzimáticos, la actividad fue determinada según se describe por Novo Industrias (*Analytical Method AF 9/6-GB*). Una unidad de actividad RE está definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 mg de almidón soluble en un minuto.

### Fermentaciones

Las fermentaciones a escala de laboratorio con la cepa MP36 transformada, se realizaron en fermentador B.E.Marubishi de 5 l (3,5 l de volumen de trabajo). Estas fermentaciones de alta densidad celular se realizaron en dos pasos; en el primero las

células se cultivaron en medio de fermentación industrial compuesto por  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1,32 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,9 g/l, urea 0,5 g/l y miel clarificada al 4% de azúcares reductores totales, durante un tiempo de 24 horas en que alcanza la fase final de crecimiento logarítmico. El segundo paso consta de adición de metanol con un flujo de 2,5 ml/h durante un tiempo de 130-150 horas. La velocidad de agitación fue de 400-600 rpm y con una aereación de 1 vvm. La temperatura fue controlada a 30°C y el pH a 5,5 con  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las electroforesis se corrieron de acuerdo con Laemmli (1970) en geles de 12% de poliacrilamida.

### Desglicosilación

La enzima alfa amilasa producida en *P. pastoris* fue desglicosilada mediante tratamiento con EndoH (Trimble y Maley, 1977).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Aislamiento e identificación del gen alfa amilasa

Para proceder al aislamiento de un gen de alfa amilasa se seleccionó una cepa de *B. licheniformis* como productora de una alfa amilasa termoestable (datos no mostrados). A partir de los resultados obtenidos por Ortlepp *et al.* (1983) para aislar el gen alfa amilasa del *B. licheniformis* NCIB 8016, se procedió a aislar de nuestra cepa el gen mediante una genoteca parcial. De 3 000 transformantes analizados, se aislaron cinco capaces de

formar halo de hidrólisis. A estos clones se les realizó análisis de restricción y resultaron tener todos el mismo patrón. A uno de los clones se le llamó pAB-24.

El mapa de restricción del fragmento EcoRI de 3 kb que contiene el gen alfa amilasa se muestra en la figura 2. El patrón de restricción obtenido coincide sólo en la parte central del fragmento de 3 kb, con los resultados obtenidos por Ortlepp *et al.* (1983) y Gray *et al.* (1986). Posteriormente se procedió a aislar de forma exacta la región codificante del gen.

Según la secuencia publicada y el diseño de los oligos, el producto de la reacción en cadena de la polimerasa debe rendir un fragmento de 1 546 pb que comprende la proteína madura y su secuencia señal. El fragmento obtenido como producto del PCR coincidió con el tamaño esperado (figura 1). Con este resultado y por hibridación en *Southern-blot* con lavados de alta astringencia de esta banda con el ADN del *B. licheniformis* NCIB 8016 (datos no mostrados), se comprobó que existe una homología muy alta entre los genes de amilasa de los dos *Bacillus*. Este fragmento, amplificado se subclonó en el plasmidio YIP-5 para su posterior manipulación (figura 2).

Para detectar un posible error en la síntesis del gen producto de la reacción de PCR, se expresó en bacteria para comprobar su funcionalidad utilizando el vector pTRIP con las condiciones de inducción descritas por Pérez *et al.* (1990), encontrándose actividad enzimática intracelular (datos no mostrados), lo cual indicó que el gen de alfa amilasa se encuentra íntegro.

## Clonación del gen alfa amilasa en *P. pastoris*

El esquema de construcción del plasmidio para la expresión del gen alfa amilasa en *P. pastoris* se muestra en la figura 2. Para integrar el casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*, el plasmidio pAP-9 se digirió previamente con las enzimas SphI y EcoRI y se transformó la cepa mutante *his<sup>-</sup> MP36*.

Las colonias de levadura transformadas que crecieron en medio restrictivo mostrando un fenotipo *his<sup>+</sup>*, se seleccionaron por actividad en placa. Todas las colonias transformantes que fueron evaluadas por este método (más de 200) dieron halo de hidrólisis de almidón sobre la placa, mostrando el mismo diámetro aproximadamente (figura 3).

Para investigar cómo fue integrado el fragmento EcoRI-SphI del plasmidio pAP-9 en el genoma de *P. pastoris* se realizó un *Southern-blot* a varios clones identificados por actividad en placa (fig.4). Se pudo observar que en todas las líneas de los ADN transformantes, excepto en la línea 7, aparece una señal de aproximadamente 9-10 kb, indicando que los genes alfa amilasa-Gapt-HIS3 han sido integrados como simple copia dentro de la región EcoRI correspondiente al locus del AOX1, el cual da una señal a la altura de 5,5 kb en la línea del ADN de la cepa no transformada usada como control.

La aparición de una única señal en los transformantes indica también que la integración ocurrió solamente en el locus AOX1. Este resultado muestra que la integración del fragmento EcoRI-SphI del pAP-9 ocurrió mediante el mecanismo de recombinación homóloga por desplazamiento en concordancia con lo planteado por Cregg *et al.* (1987). Este fenómeno se

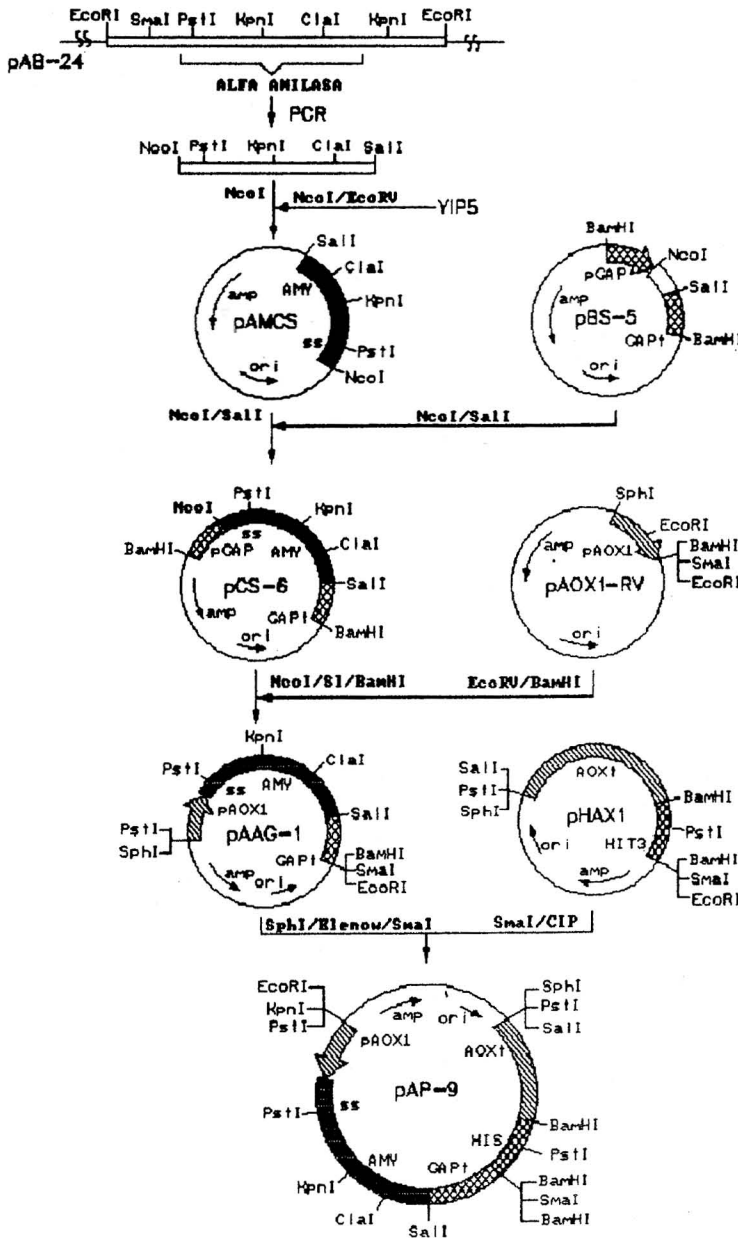


FIG. 2. Mapa de restricción del plasmidio pAB-24 y el esquema de construcción para la clonación y expresión del gen alfa amilasa en *P. pastoris* bajo el control del promotor AOX1 de *P. pastoris*. El vector final de clonación pAP-9 contiene el gen alfa amilasa de *B. licheniformis* CIB-25 con su propia secuencia señal, el promotor AOX1 de *P. pastoris*, la secuencia terminadora del gen gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa, el gen His3 de *S. cerevisiae* y la región 3' del gen AOX1 de *P. pastoris*. Este plasmidio se digiere con las enzimas EcoRI/SphI para la integración del fragmento de expresión en el genoma de la levadura hospedera.

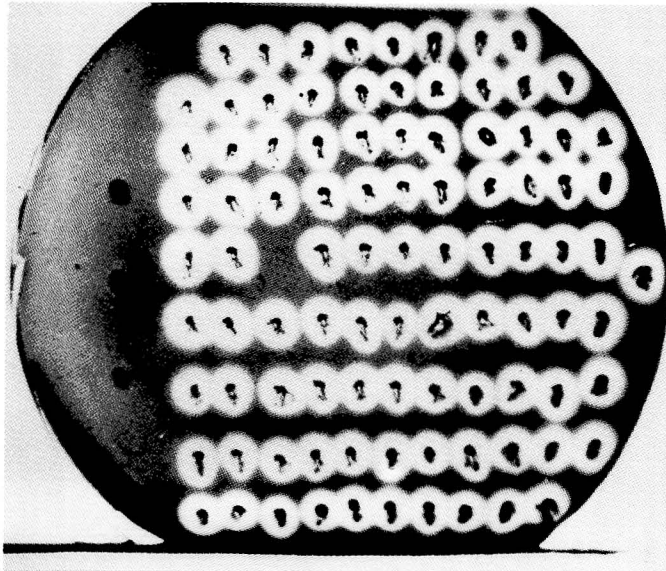


FIG. 3. Identificación en placa de los transformantes de *P. pastoris* productores de alfa amilasa. Las tres colonias a la izquierda de la placa son células de *P. pastoris* MP36 no transformadas, utilizadas como control negativo. Los halos de hidrólisis aparecen en blanco después de la tinción con yodo (Materiales y Métodos).

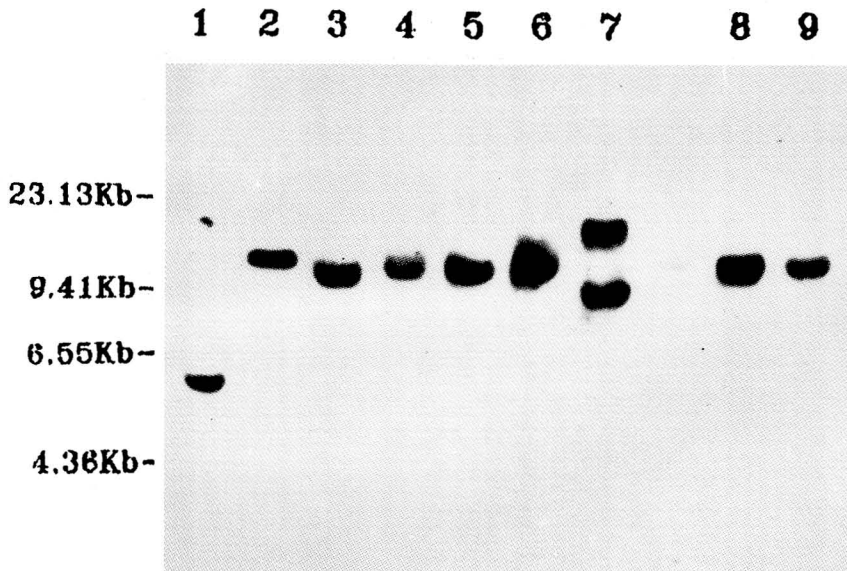


FIG. 4. Análisis por *Southern-blot* de los ADN de las células transformantes de *P. pastoris*. El ADN cromosomal de las levaduras transformantes (*his*<sup>+</sup> y *amy*<sup>+</sup>) (líneas 3-9), el ADN de la cepa no transformada (línea 1) y el plasmidio pAP-9 (línea 2) fueron digeridos con EcoRI. De los ADN cromosomales se aplicaron 10  $\mu$ g para cada caso y del pAP-9 2 ng. El fragmento PstI/EcoRV del plasmidio pAOX1-RV correspondiente a la región del promotor AOX1 fue utilizado como sonda radiactiva para hibridar el filtro. Los patrones de peso molecular aparecen en la figura.

evidenció en el 90% de los clones analizados. Esto pudiera explicar la similitud en la expresión de alfa amilasa detectada por actividad en placa, así como en estudios de inducción para selección de clones productores realizados a escala de 50 ml (datos no mostrados).

### Expresión y secreción de alfa amilasa en *P. pastoris*

Uno de los transformantes de *P. pastoris* fue escogido para estudios de fermentación-inducción. En la figura 5 se muestran los resultados del crecimiento y actividad de este clon durante la fermentación. En ella se observa que en las primeras 40 horas la actividad alfa amilasa no es detectada en el sobrenadante de cultivo, pero después de inducido el cultivo con metanol comienza a incrementarse gradualmente llegando

a valores altos de actividad enzimática (mayor que 500 URE/ml) los cuales representan aproximadamente 0,9 g/l. El hecho de los altos valores de actividad alfa amilasa encontrada en el sobrenadante de cultivo indica que la secuencia señal para la secreción de esta enzima en *Bacillus* funciona como tal en esta levadura. Resultados similares en la expresión de alfa amilasa de *B. amiloliquefaciens* en *S. cerevisiae* fueron encontrados por Ruohonen *et al.* (1987), donde la enzima se secretó eficientemente y más del 75% de la actividad total fue encontrada en el medio de cultivo.

En nuestros experimentos no se determinó la actividad enzimática intracelular y periplasmática, lo cual sería de interés conocer si parte de esta enzima queda atrapada en alguno de los pasos del mecanismo de secreción.

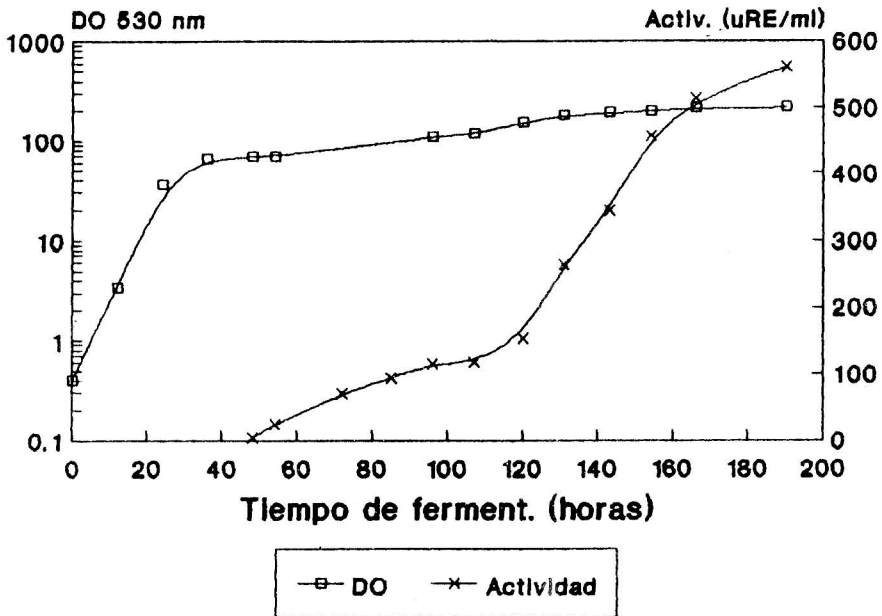


FIG. 5. Curvas de variación de actividad enzimática y densidad óptica en dependencia del tiempo de fermentación. Al medio se le adicionó metanol a las 40 horas de cultivo.



## Glicosilación de la proteína

La alfa amilasa de *B. licheniformis* NCIB 8016 como enzima bacteriana no es glicosilada, pero su secuencia aminoacídica contiene seis sitios potenciales de N-glicosilación. En nuestro caso, aunque no conocemos la secuencia aminoacídica de la proteína, por la homología tan alta encontrada a nivel de ADN podemos esperar que nuestra proteína pudiera ser muy similar en secuencia aminoacídica, y por tanto, en la cantidad de posibles sitios de N-glicosilación. En la figura 6 se muestra la alfa amilasa excretada por *P. pastoris* con un peso molecular mayor que el de la proteína nativa de *B. licheniformis*. El tratamiento con la enzima EndoH realizado a la proteína recombinante demuestra que se produce

N-glicosilada, lo cual sugiere que la enzima es secretada a través de las vías normales de secreción de esta levadura.

En este trabajo no se determina qué porcentaje de glicosilación presenta, ni qué variaciones puede este provocar en cuanto a estabilidad térmica y actividad específica. En trabajos previos se ha planteado que esta glicosilación no afecta la actividad enzimática e incluso le confiere cierta estabilidad al enzima (Ruohonen *et al.*, 1987). Estos estudios se están llevando a cabo en nuestro laboratorio.

## REFERENCIAS

CORNELIS, P.; C. DIGNEFFE y K. WILLEMOT (1982). Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 186: 507-511.

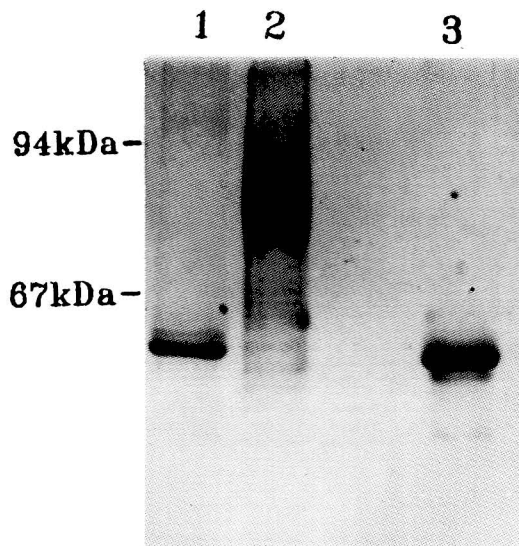


FIG. 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (12%) de las enzimas producidas en *B. licheniformis* y *P. pastoris*. La línea 1) corresponde a la enzima alfa amilasa del *B. licheniformis*; línea 2) enzima producida en *P. pastoris*; la línea 3) es la misma enzima tratada con EndoH (Materiales y Métodos). Los patrones de peso molecular aparecen en la figura.

- CREGG, J.M.; K.J. BARRINGER; A.Y. HESSLER y K.R. MADDEN (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376-3385.
- CREGG J.M.; J.F. TSCHOPP; C. STILLMAN; R. SIEGEL; M. AKONG; W.S. CRAIG; R.G. BUCKHOLZ; K.R. MADDEN; P.A. KELLARIS; G.R. DAVIS; B.L. SMILEY; J. CRUZE; R. TORREGROSSA; G. VELICELEBI y G.P. THILL (1987). High level expression and efficient assembly of Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 5: 479-485.
- DUBNAU, D. y R. DAVIDOFF-ABELSON (1971). Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. Formation and properties of the donor recipient complex. *J. Mol. Biol.* 56: 209-221.
- GALZY, P. y P.P. SLONIMSKI (1957). Variation de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique ou sur glucose comme source de carbone. *Paris. C.R. Acad. Sci.* 245: 2423-2427.
- GRAY, G.L.; S.E. MAINZER; M.W. REY; M.H. LAMSA; K.L. KINDLE; C. CARMONA y C. REQUADT (1986). Structural genes encoding the thermophilic alpha amylases of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 166: 635-643.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227: 680-685.
- MANIATIS, T.; E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. USA.
- ORTLEPP, S.A.; J.F. OLLINGTON y D.J. Mc CONNELL (1983). Molecular cloning in *Bacillus subtilis* of a *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable alpha amylase. *Gene* 23: 267-276.
- PEREZ, L.; J. VEGA; C. CHUAY; A. MENENDEZ; R. UBIETA; M. MONTERO; G. PADRON; A. SILVA; C. SANTIZO; V. BESADA y L. HERRERA (1990). Production and characterization of human gamma-interferon from *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 429-434.
- RODRIGUEZ, L.; E. NARCIANDI; H. ROCA; V. MUZIO; J. MORALES; G. DE LA RIVA; V. JIMENEZ; J. CREMATA; R. MONTESINOS; J. HERNANDEZ; E. RODRIGUEZ; L. HERRERA y J. DELGADO (1991). Invertase secretion in *H. polymorpha* under the AOX1 promoter from *P. pastoris*. *Biotechnologia Aplicada*. (En proceso editorial.)
- RUOHONEN, L.; P. HACKMAN; P. LEHTOVAARA; J.K. KNOWLES y S. KERANEN (1987). Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase cells by its own signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* host. *Gene* 59: 161-170.
- SALKI, R.K.; D.H. GELFARD; S. STOFFEL; S.J. SHARF; R. HIGUCHI; G.T. HORN; K.B. MOLLIS y H.A. ERLICH (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- TRIMBLE, R.B. y F. MALEY (1977). Subunit structure of external invertase from *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 252(12): 4409-4412.
- TSCHOPP, J.F.; P.F. BRUST; J.M. CREGG; C.A. STILLMAN y T.R. GINGERAS (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids. Res.* 15: 3859-3876.
- TSCHOOP, J.F.; G. SVERLOW; R. KOSSON; W. CRAIG y L. GRINNA (1987). High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 5: 1305- 1308.
- TSUKAGOSHI, N.; H. IHARA; H. YAMAGATA y S. UDAKA (1984). Cloning and expression of a thermophilic alpha amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 193: 58-63.
- YONG, V.; M.E. GONZALEZ; L. HERRERA y J. DELGADO (1992). El gen HIS-3 de *S. cerevisiae* complementa una mutación his<sup>-</sup> de *P. pastoris*. *Biotechnologia Aplicada* 9(1): 55-61.