

# ELEVADO NIVEL DE EXPRESION DE UNA ALFA AMILASA CON LA SECUENCIA SEÑAL DEL SUC2 EN *Pichia pastoris*

Edenia Paifer, Emilio Margolles, Julio Delgado

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

Recibido en febrero de 1992. Aprobado en noviembre de 1992.

Key words: *Pichia pastoris*,  $\alpha$ -amylase, expression of  $\alpha$ -amylase in yeast.

## SUMMARY

A *Bacillus licheniformis* CIB-25  $\alpha$ -amylase gene has been cloned and expressed in *Pichia pastoris* using the *Saccharomyces cerevisiae* Sucrose invertase gene (SUC2) signal sequence and under the control of *Pichia pastoris* AOX1 (alcohol oxidase) promoter. The expression fragment containing the alpha amylase gene was integrated as a single copy in the AOX1 locus of *Pichia pastoris*. Higher expression levels of  $\alpha$  amylase gene were obtained (more than 2.5 g/l) compared to previous genetic constructions. Secretion was very efficient using the signal sequence of SUC2 gene, since the  $\alpha$  amylase activity in the culture medium represented more than 95% of the total activity.

## RESUMEN

En este trabajo se presenta la clonación y expresión en *Pichia pastoris* del gen  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25 con la secuencia señal del gen sacarosa invertasa (SUC2) de *Saccharomyces cerevisiae* y bajo el control del promotor AOX1 (alcohol oxidasa) de *Pichia pastoris*. El fragmento de expresión que contiene el gen alfa amilasa se integró como simple copia dentro de una región perteneciente al locus del AOX1 de *Pichia pastoris*. Se lograron altos niveles de expresión de alfa amilasa (más de 2.5 g/l) que superaron los alcanzados por otras construcciones para expresar alfa amilasa en levadura. Se observó que con la secuencia señal del SUC2 hubo una alta eficiencia en la secreción de alfa amilasa lográndose más del 95% de la enzima en el medio de cultivo.

## INTRODUCTION

Recientemente, en nuestro laboratorio, ha sido clonado y expresado en la levadura *Pichia pastoris* el gen  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25 con su propia secuencia señal, bajo el control del promotor AOX1 (Margolles *et al.*, 1992), resultando atractivo este hospedero para la producción de  $\alpha$  amilasa, ya que se reiteraron las ventajas descritas para esta levadura en cuanto a nivel de expresión, secreción y glicosilación. (Cregg *et al.*, 1987; Tschopp *et al.*, 1987). Los niveles de la enzima alcanzados con esta construcción fueron de 0.9 g/l y son inferiores a los obtenidos por otros autores para otras proteínas (Tschopp *et al.*, 1987, Yong *et al.*, 1992).

Lo anteriormente dicho y la capacidad de esta levadura para secretar la enzima  $\alpha$  amilasa al medio de cultivo hacen a este hospedero interesante para continuar estudios en cuanto al aumento de expresión de esta proteína.

En trabajos anteriores, se ha descrito la utilización de la secuencia señal del gen sacarosa invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* para excretar proteínas foráneas como: interferón (Chang *et al.*, 1986) y sacarosa invertasa (Yong *et al.*, 1992); donde estas proteínas se transportaron eficientemente, con un procesamiento correcto de la secuencia señal.

Debido a lo anteriormente planteado, en este trabajo se utilizó la secuencia señal del gen SUC2, acoplada a la región que codifica para la proteína madura del gen alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25 y regulada por el promotor AOX1, con vistas a aumentar los niveles de expresión del gen alfa amilasa respecto a los obtenidos por Margolles y colaboradores (1992) en la expresión de este gen con su propia secuencia señal.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas de levaduras y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron:

CEPAS	GENOTIPOS	REFERENCIAS
<i>Pichia pastoris</i> MP36	his <sup>-</sup>	Young <i>et al.</i> , 1992
<i>Pichia pastoris</i> MPA3692	pAP-9, amy <sup>+</sup>	Margolles <i>et al.</i> , 1992
<i>Pichia pastoris</i> MPA3625	pPSA-3, amy <sup>+</sup>	Este trabajo

La levadura *Pichia pastoris* MP 36 (his<sup>-</sup>) se multiplicó en medio YPG (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, y glucosa 20 g/l). La cepa de levadura *Pichia pastoris* MPA 3625 transformada con el plasmidio pPSA-3 (figura 1) y *Pichia pastoris* MPA 3692 transformada con el pAP-9 (Margolles *et al.*, 1992) se crecieron en medio GO (Galzy y Slonimski, 1957).

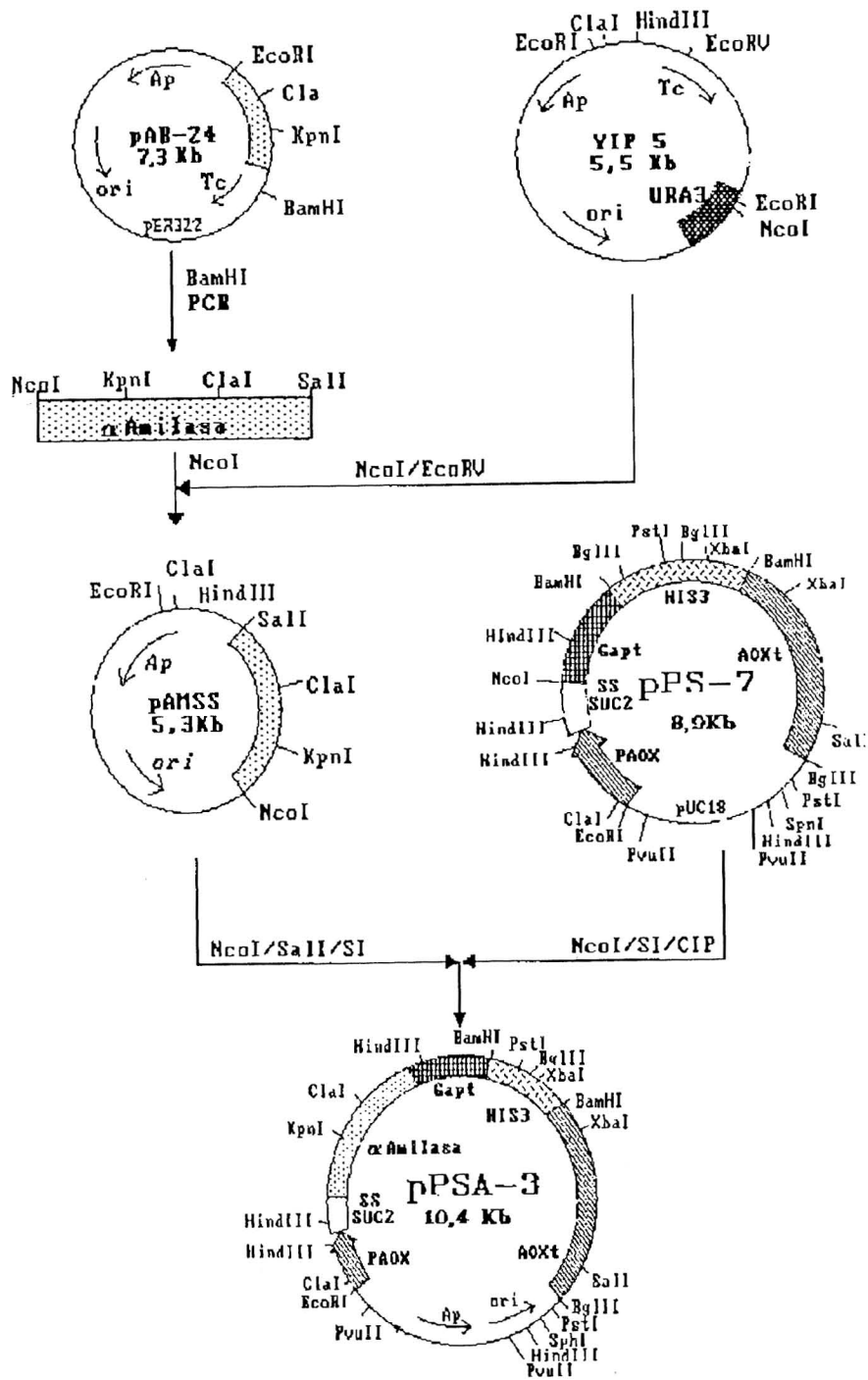


Fig. 1. Esquema de construcción integrativa para la clonación y expresión del gen  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25 en *Pichia pastoris*. El vector final de clonación, pPSA-3, contiene el gen  $\alpha$  amilasa con la secuencia señal del SUC2 (SP SUC2), el promotor AOX1 de *P. pastoris* (PAOX), la secuencia terminadora del gen gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (Gapt), el gen HIS3 de *Saccharomyces cerevisiae*, y la región 3' del gen AOX1 de *P. pastoris* (AOXt). Este plasmidio se digiere con las enzimas EcoRI y SphI para la integración del fragmento de expresión en el genoma de la levadura hospedera. Abreviaturas: SI, exonucleasa SI; CIP, fosfatasa alcalina de ternero.

## Transformación

El método de transformación por protoplastos utilizado para transformar la cepa de levadura MP 36 fue descrito por Cregg y colaboradores (1985) y se realizaron algunas modificaciones (Yong *et al.*, 1992).

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El PCR se realizó a partir del plasmidio pAB-24 tal y como se describe por Salki y colaboradores (1988) y tomando como referencia la secuencia del gen  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* NCIB 8016 publicada por Gray *et al.* (1986) para el diseño de los oligonucleótidos. Las secuencias de los oligos utilizados son las siguientes:

oligo 5': 5'- GCCATGGCAAATCTTAATGGGA -3'

oligo 3': 3'- GTTAAATACAAGTTTCTATCCAGCTGC -5'

Para facilitar la clonación del gen el oligo correspondiente a la región 5' del gen incluye en este extremo un sitio NcoI y el oligo correspondiente a la región 3' del gen incluye un sitio Sall.

## Southern-blot

El Southern-blot se realizó según Maniatis y colaboradores (1982). La hibridación se realizó a 42°C en 6xSSC, solución de Denhardt 5x, 0.5% de SDS y 100  $\mu$ g/ml de ADN de timo. Los lavados fueron hechos hasta 55°C con 0.2x SSC y 0.1% de SDS. Se utilizó como sonda radiactiva un fragmento correspondiente a la región del promotor AOX1 aislado del plasmidio pPS-7 por digestión con EcoRI y HindIII.

## Condiciones de inducción y expresión de la enzima

Las fermentaciones a escala de laboratorio se realizaron con las cepas transformadas *Pichia pastoris* MPA 3625 y MPA 3692 en fermentadores B.E. Marubishi de 5 l (3.5 l de volumen de trabajo). Estas fermentaciones de alta densidad celular se realizaron en dos etapas, en la primera 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 h en que alcanza la fase de crecimiento logarítmico tardío. La segunda etapa (inducción) consta de una adición de metanol a un flujo de 2.5 ml/h-l durante un tiempo de 120-150 h. La velocidad de agitación fue de 400-600 rpm y con la aereación de 1 vvm. La temperatura fue controlada a 30°C y el pH a 5.5 con  $\text{NH}_4$  y  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

## Detección y ensayo de actividad $\alpha$ amilasa

Para la selección de levaduras transformantes se utilizó el método de actividad en placa según se describe por Margolles y colaboradores (1992).

La enzima periplasmática e intracelular se obtuvo resuspendiendo 300 mg de células en 10 ml de sorbitol 1 M, EDTA 25 mM y DTT 15 mM e incubación a temperatura ambiente durante 15 min. Las células fueron lavadas con 10 ml de sorbitol 1 M y resuspendidas en 10 ml de sorbitol 1 M, citrato de sodio 0.1 M, EDTA 25 mM y 0.008 mg/ml de Zymolasa, incubadas durante 1-2 horas a 37°C hasta 70-100% de formación de protoplastos. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 10-30 min. y la enzima periplasmática se recuperó en el sobrenadante. Los protoplastos se lisaron en 400  $\mu$ l de agua para obtener la enzima intracelular.

En los extractos celulares, la actividad enzimática se determinó por incubación de 0.1 ml del extracto con 0.2 ml de almidón soluble al 0.7% (pH 5.6), durante 10 min. a 37°C. La reacción se detuvo por enfriamiento en hielo 2 min. y mezclando 0.1 ml de la reacción con 0.9 ml de HCl 50 mM. Posteriormente se adicionó 1 mL de solución B de yodo (40.17 g/L de KI y 0.088 g/L de  $\text{I}_2$ ) y 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . La densidad óptica de la coloración azul fue determinada a 620 nm. Todas las soluciones usadas en la determinación de actividad  $\alpha$  amilasa se prepararon de acuerdo a como 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 1 min y en las condiciones descritas anteriormente.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Clonación del gen $\alpha$ amilasa

El aislamiento e identificación del gen alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25 (colección de cepas del CIGB) se realizó en nuestro laboratorio (Margolles *et al.*, 1992). A partir del plasmidio pAB-24, que contiene el gen completo, se realizó un PCR con los oligonucleótidos descritos en materiales y métodos. El producto del PCR rindió un fragmento de 1.45 kb que comprende solamente la proteína madura. El gen amplificado se digirió con la enzima NcoI para ser subclonado en el plasmidio YIP 5. Todo el esquema de construcción para obtener el vector final de clonación se presenta en la figura 1. El plasmidio pPS-7, el cual se construyó con el objetivo de expresar proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* (Solicitud de Patente Europea EP 438 200 A1), se utilizó como vector final de clonación. De esta forma quedan acoplados en el vector de expresión pPSA-3, el gen alfa amilasa con la secuencia señal del gen sacarosa invertasa por el extremo 5' y por el extremo 3' la secuencia terminadora del gen gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, regulado por el promotor AOX1 de *Pichia pastoris*. Para mayor eficiencia en la integración, el plasmidio pPSA-3 se digirió con las enzimas EcoRI y SphI para transformar la levadura *Pichia pastoris* MP 36 (his<sup>-</sup>). Para la selección de los transformantes se utilizó el gen HIS3 de *Saccharomyces cerevisiae* que complementa la mutación de la levadura hospedera (Yong *et al.*, 1992).

### Selección de los transformantes

Las colonias de levaduras transformadas que crecieron en medio restrictivo GO sin histidina, mostrando un fenotipo his<sup>+</sup>, se seleccionaron por el método de actividad en placa. Se analizaron más de 400 colonias por este método y todas dieron halo de

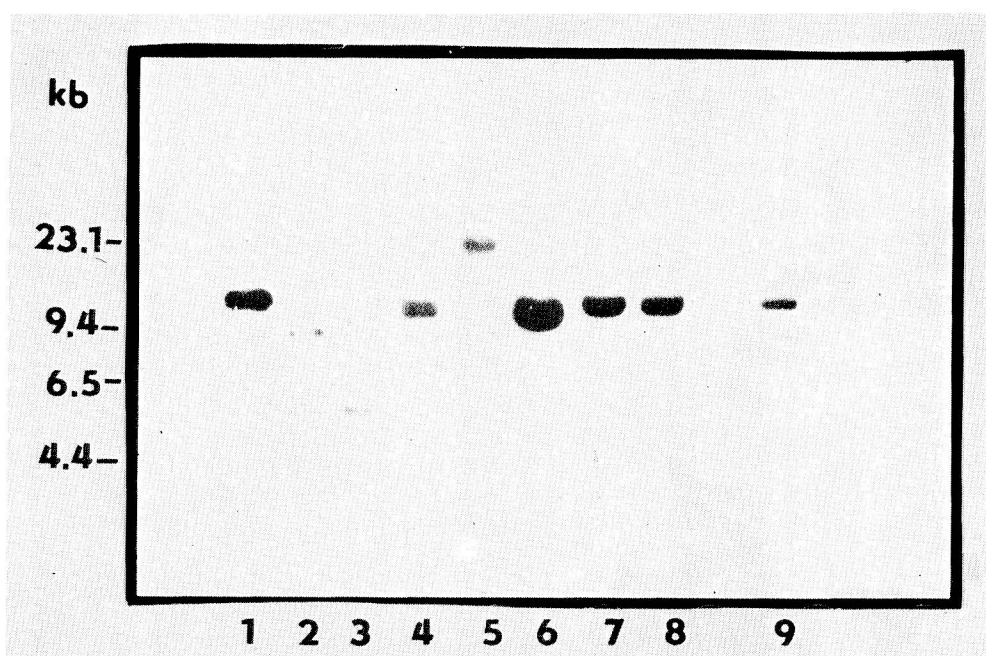


Fig. 2 Southern-blot de los ADN de las células transformantes de *Pichia pastoris*. Línea 1, pPSA-3 digerido con EcoRI; línea 2, pPSA-3 digerido con EcoRI y SphI; línea 3, ADN cromosomal de la cepa no transformada (MP 36) digerido con EcoRI; líneas 4-9, ADN cromosomal de levaduras transformantes ( $his^+$  y  $amy^+$ ) digeridos con EcoRI. Se aplicaron aproximadamente 10  $\mu$ g de cada ADN cromosomal y 2 ng del pPSA-3. Se utilizó como sonda radiactiva un fragmento correspondiente a la región del promotor AOX1 aislado del plasmidio pPS-7 por digestión con EcoRI y HindIII.

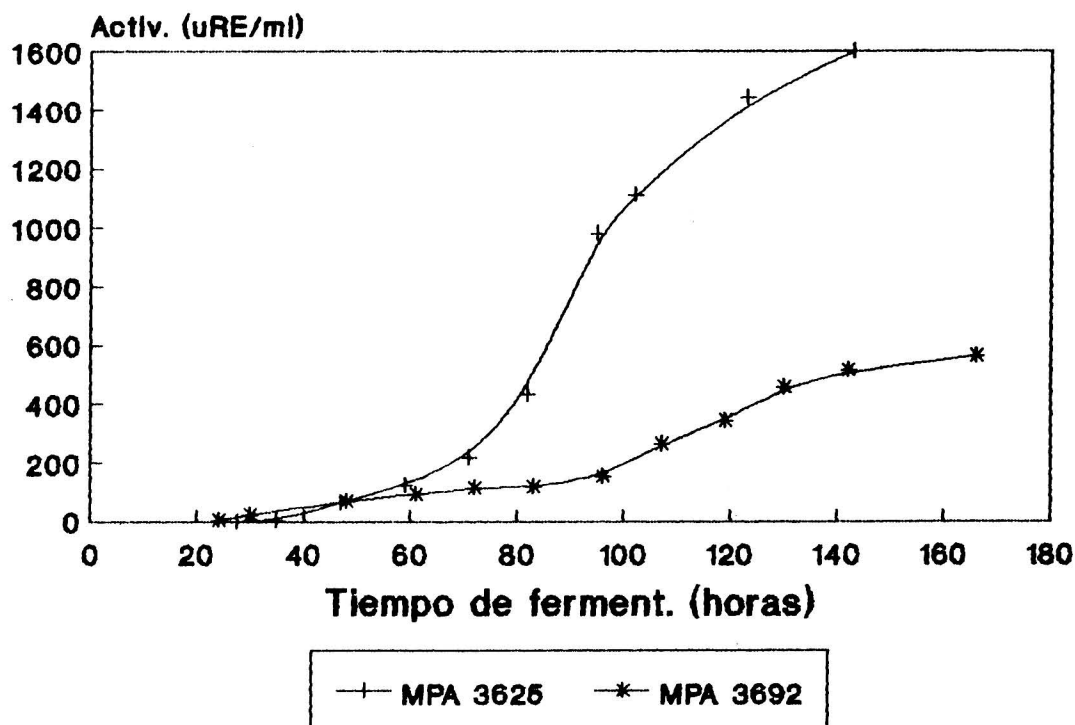


Fig. 3 Curva de incremento de actividad alfa amilasa en el sobrenadante de los clones MPA 3625 y MPA 3692 durante la fermentación. Las curvas resultantes son el promedio de las actividades de 3 fermentaciones.

hidrólisis de almidón sobre la placa con aproximadamente el mismo diámetro (resultados no mostrados).

Algunas de las cepas con fenotipo his<sup>+</sup>, amy<sup>+</sup> se escogieron para analizar por Southern-blot si la integración ocurrió de la forma esperada. En la figura 2 se observa en las líneas 4, 6, 7, 8 y 9 pertenecientes a los ADN genómicos de los transformantes escogidos, una señal de talla entre 9-10 kb, demostrando que el fragmento de expresión EcoRI-SphI del plasmidio pPSA-3, se integró como simple copia dentro de la región EcoRI perteneciente al locus del AOX1, el cual da una señal de 5.5 kb al digerirse el genoma de la levadura no transformada con la misma enzima EcoRI. La aparición de una única señal de estos transformantes indica también que la integración ocurrió solamente en el locus AOX1.

Resultados similares fueron obtenidos en nuestro laboratorio cuando se analizaron los transformantes con el plasmidio pAP-9 (Margolles *et al.*, 1992).

#### Expresión del gen alfa amilasa

A uno de los clones con actividad  $\alpha$  amilasa y patrón de integración correcto (figura 2, línea 8) se le llamó MPA 3625 y se escogió para realizar fermentaciones a escala de laboratorio (ver materiales y métodos).

La figura 3 muestra los resultados del incremento de actividad  $\alpha$  amilasa de MPA 3625 durante la fermentación. Como se observa, la actividad no es detectada en el sobrenadante antes del momento de inducción (24 horas), comenzando a incrementarse 12 horas después de inducido con metanol el cultivo (aproximadamente 36 horas de fermentación).

Para comparar los niveles de expresión y secreción de  $\alpha$  amilasa de esta cepa con respecto a la cepa MPA 3692 (Margolles *et al.*, 1992), la cual sólo se diferencia en que se utiliza la secuencia señal de  $\alpha$  amilasa, ambas cepas se fermentaron en iguales condiciones con el objetivo de medir la actividad enzimática extracelular, periplasmática e intracelular.

Al final de la fermentación se obtuvieron valores muy altos de actividad enzimática en el sobrenadante para la cepa MPA 3625, de aproximadamente 1600 uRE/ml (más de 2.5 g/l) que están muy por encima de los alcanzados por la cepa MPA 3692 (figura 3).

En cuanto a la secreción de la enzima, la cepa MPA 3692 se comportó de forma eficiente, ya que más del 75% de la proteína total producida fue excretada al medio de cultivo y solamente el 1.3% se quedó intracelular, quedando acumulada en el periplasma

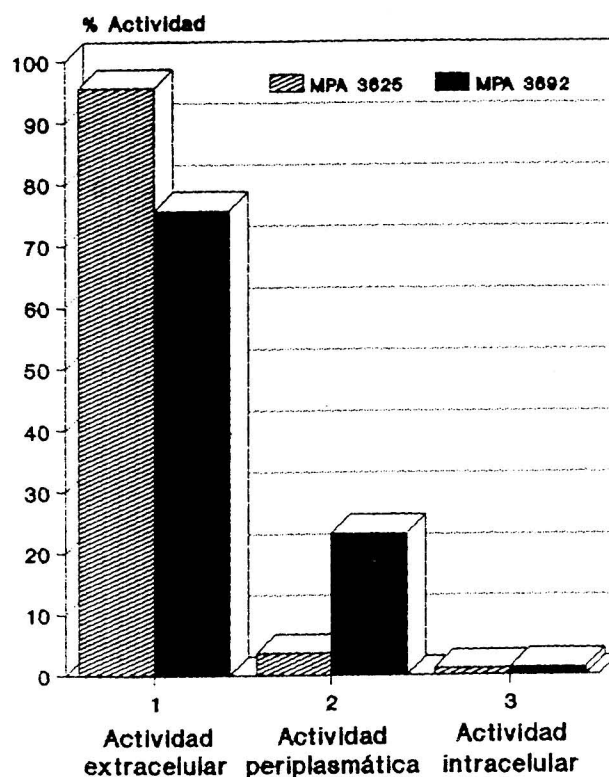
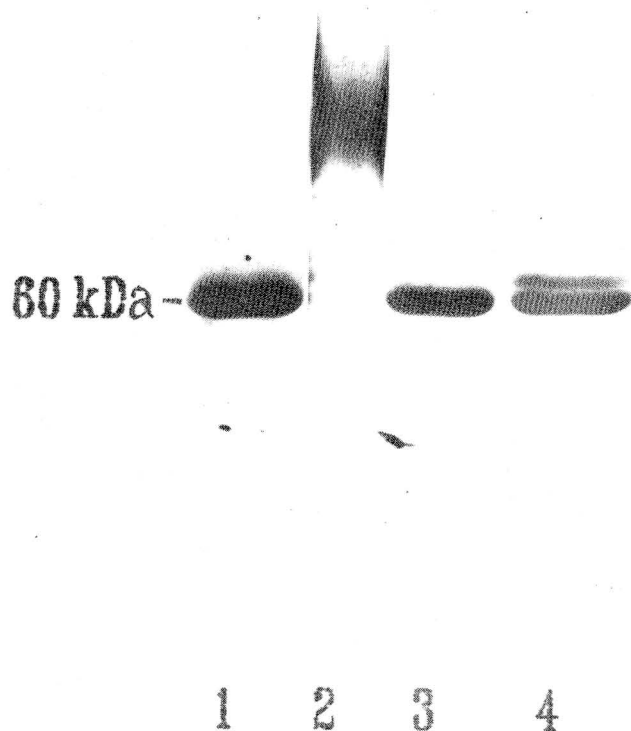


Fig. 4 Actividad  $\alpha$  amilasa extracelular, periplasmática e intracelular de las cepas MPA 3625 y MPA 3692. Los valores son el resultado de 3 experimentos

el 23.1% (figura 4). Resultados muy similares fueron obtenidos por Ruohonen y colaboradores (1987) en la secreción de  $\alpha$  amilasa bacteriana con su propia secuencia señal en *S. cerevisiae*, donde también se secretó al medio el 75% de la proteína total y se quedó intracelularmente el 25%. La cepa MPA 3625 fue mucho más eficiente en la secreción de la enzima al medio de cultivo excretando más del 95% de la proteína total y encontrándose cantidades muy bajas de proteína periplasmática (3.7%) e intracelular (1.1%).

En cuanto al nivel de expresión, la cepa MPA 3625 es superior (más de 3 veces) a la cepa MPA 3692. Hasta este momento no conocemos la causa de estas diferencias en la síntesis de  $\alpha$  amilasa, pero pudieran ser debido a varios factores. Aunque en la cepa MPA 3692, con la presencia de una señal de secreción de origen bacteriano, la secreción de  $\alpha$  amilasa fue eficiente, existe una acumulación de un 23% de la proteína en el periplasma que pudiera ser limitante para una mayor expresión. No se descarta que las diferencias puedan estar dadas a nivel de ARNm, aunque ambas construcciones génicas fueron muy similares e integradas de la misma forma en el locus AOX1.





**Fig. 5** Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Línea 1, alfa amilasa comercial de Novo, Dinamarca (Termamil 60L); línea 2, alfa amilasa de MPA 3625; línea 3,  $\alpha$  amilasa de *Bacillus licheniformis* CIB-25; línea 4,  $\alpha$  amilasa de MPA 3625 tratada con EndoH.

Además, resultados anteriores en la expresión de interferón en levadura usando diferentes secuencias señales y un mismo promotor, demostraron que el nivel de transcripción y la estabilidad del ARNm de interferón era muy similar en todas las construcciones, por lo que las diferencias de expresión de proteína pudieran estar a nivel de la traducción y/o estabilidad de la proteína (Chang *et al.*, 1986).

En estos momentos estamos realizando experimentos para comprobar estas posibilidades, aunque los resultados anteriores indican que la secuencia señal del gen SUC2 resultó ser más eficiente que la secuencia señal de la  $\alpha$  amilasa para la secreción de esta enzima en *Pichia pastoris*.

En la figura 5 se muestra que la  $\alpha$  amilasa excretada al medio de cultivo por la cepa MPA 3625 tiene un peso molecular mayor que el de la proteína nativa. Experimentos de desglicosilación con EndoH, evidenciaron que la proteína en *Pichia pastoris* se produce N-glicosilada. Se están llevando a cabo estudios acerca del efecto que puede provocar la glicosilación en la estabilidad térmica y actividad específica de la  $\alpha$  amilasa. No obstante se ha

reportado que la glicosilación no necesariamente deteriora a la proteína que carece de cadenas de azúcar en su forma natural y que la actividad enzimática de la  $\alpha$  amilasa no fue afectada por la presencia de los glicanos (Ruohonen *et al.*, 1987).

## REFERENCIAS

- CHANG, C. N.; M. MATTEUCCI.; J. PERRY; J. J. WULF; C. Y. CHEN; R. A. HITZEMAN (1986). *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1812-1819.
- CREGG, J. M.; 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. TORREGOSA; G. VELICELEVI; and G. P. THILL (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 479-485.
- GALZY, P. and P. P. SLONIMSKI. (1975). Variation de la levure au cours de la croissance sur 1 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 and C. REQUADT. (1986). Structural genes encoding the thermophilic alpha amylases of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 166: 635-643.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH and J. SAMBROOK. (1982). Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. USA.
- MARGOLLES, E.; E. PAIFER and J. DEGADO. (1992). Alto nivel de expresión de una enzima alfa amilasa bacteriana en la levadura *Pichia pastoris*. *Biocología Aplicada*. 9: 38-47.
- RUOHONEN, L.; P. HACKMAN; P. LEHTOVAARA; J. KNOWLES and 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; and H.A. ERLICH (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491. Solicitud de Patente Europea EP 438 200 A1.
- TSCHOPP, J. F.; P. F. BRUST; J. M. CREGG; C. A. STILLMAN and GINGERAS, T. R. (1987). Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucl. Acids. Res.* 15: 3859-3876.
- TSCHOPP, J. F.; G. SVERLOW; KOSSON; W. CRAIG and L. GRINNA (1987). High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/technology*. 5: 1305-1308.
- YONG, V. and J. DELGADO (1992). Aislamiento de mutantes en *Pichia pastoris*. *Biocología Aplicada*. En prensa.
- YONG, V.; M. E. GONZÁLEZ; L. HERRERA and J. DELGADO, (1992). El gen HIS3 complementa una mutación his<sup>-</sup> de *Pichia pastoris*. *Biocología Aplicada*. 9: 55-61.
- YONG, V.; E. MARGOLLES y J. DELGADO (1992). Alto nivel de expresión de sacarosa invertasa en *Pichia pastoris*. *Biocología Aplicada*. En prensa.