

ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DEL INTERFERON α -2 HUMANO SECRETADO EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Ricardo Silva, Juan Morales Grillo, Antonieta Herrera, Gustavo Furrázola, Marisel Quintana, Alejandro Silva, José de la Fuente, y Luis Herrera

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

Recibido en julio de 1992. Aprobado en mayo de 1993

Key words: Processing in *S. cerevisiae*, human IFN α -2, glycosylation.

SUMMARY

Here, we show that the human recombinant Interferon α -2 (IFN α -2 rec.) expressed in *S. cerevisiae* is secreted glycosylated to the culture medium. Experiments performed with culture supernatants from the IFN α -2-secretory yeast treated with endoglycosidase H (Endo-H) enzyme "in vitro" and with the inhibitor tunicamycin "in vivo", demonstrated this glycosylation to be of type N, which may be originated by an incomplete processing of the pro- α factor IFN α -2 precursor. The glycosylation had no effect on the biological activity of the IFN α -2 rec.

RESUMEN

En el presente trabajo, se evidenció que el Interferón α -2 recombinante humano (IFN α -2 rec.) expresado en *S. cerevisiae* se secreta glicosilado al medio de cultivo. Experimentos realizados con sobrenadantes de cultivos de la levadura secretora de IFN α -2 tratados con la enzima endoglicosidasa H (Endo-H) "in vitro" y con el inhibidor tunicamicina "in vivo", demostraron que esta glicosilación es del tipo N, la cual pudiera ser originada por un procesamiento incompleto del precursor pro-factor -IFN -2. La glicosilación no tuvo efecto sobre la actividad biológica del IFN α -2 rec.

INTRODUCCION

Las levaduras han mostrado ser un hospedero atractivo para la secreción de glicoproteínas de interés industrial o farmacéutico (Moir y Dumais, 1987). Estos microorganismos poseen un aparato de secreción muy semejante al de los organismos superiores (Huffaker y Robbins, 1982; Snider, 1984). Sin embargo, muchas proteínas se glicosilan cuando son secretadas por sus hospederos y aunque se conoce de la habilidad de las levaduras para glicosilar sus proteínas endógenas, poco se sabe de la capacidad de estos microorganismos de glicosilar proteínas heterólogas correctamente. Como parte de un esfuerzo por entender este fenómeno, se estudió el procesamiento del IFN α -2 rec. secretado en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los interferones (IFN) humanos representan un grupo de proteínas celulares inducibles de amplia acción antiviral, antiproliferativa e inmuno-regulatoria

(Stewart II, 1980). Nuestro grupo ha clonado y expresado el IFN α -2 en *E. coli* (Silva et al., 1988) y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (de la Fuente et al., 1988).

En este trabajo, se evidenció que el IFN α -2 rec. expresado por la levadura *S. cerevisiae* se secreta glicosilado al medio de cultivo, y esta glicosilación es del tipo N. Esta modificación post-traducciona, que pudiera estar asociada a un procesamiento incompleto del precursor del pro-factor α no tuvo implicaciones sobre la actividad biológica del IFN α -2 rec.

MATERIALES Y METODOS

Cepa de microorganismo empleada

La levadura *S. cerevisiae* SEY-2202 (leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, his 3-519), contiene el plasmidio de expresión pYCB-129 construido previamente por de la Fuente et al. (1988), el cual permite una secreción eficiente del IFN α -2 rec. bajo el control de la secuencia regulatoria (promotor) del gen de la enzima glicolítica gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GFD), la señal de secreción del pre-pro-factor α de levadura, un gen defectivo para la leucina, y el gen del uracilo 3.

Medios y condiciones de cultivo

Se empleó el medio GO (Galzy y Slonimski, 1957) suplementado con los requerimientos auxotróficos del microorganismo. Para el pre-inóculo, se partió de un stock de glicerol; se inocularon 5 ml de medio y se crecieron 24 h a 30°C. El inóculo se creció en zaranda a 240 rpm, durante 16 h a 30°C. Las fermentaciones se realizaron según Pérez et al. (1990).

Tratamiento "in vitro" con endoglicosidasa H (Endo-H)

El ensayo se realizó según lo descrito (Lehle et al., 1979), con algunas modificaciones. La enzima endo-N-acetyl glucosaminidase II (Endo-II) (Boehringer, RFA), se disolvió en tampón citrato de sodio 50 mM pH 5.5 a una concentración de 1mg/ml, y se empleó a razón de 0,32 miliunidades por microgramo de proteína total, en sobrenadantes de cultivos durante 3 h a 37°C. El tratamiento se repitió dos veces a cada muestra.

Ensayo de inhibición de la glicosilación "in vivo"

Para realizar este ensayo se utilizó el antibiótico tunicamicina (Boehringer, RFA), conocido agente inhibidor de la glicosilación. Se empleó el medio GO conteniendo glucosa al 2%, hidrolizado de caseína al 2%, y extracto de levadura al 1%. La $DO_{(600\text{ nm})}$ inicial fue de 0,1-0,2. Cuando la fermentación alcanzó 1 DO, se tomaron muestras (500 μ l) para medir actividad de IFN y se consideró como tiempo cero este punto del crecimiento. A continuación, se tomaron dos muestras de 500 ml cada una y se centrifugaron a 3200 rpm. Las células fueron colectadas y lavadas en PBS pH 7,2 y luego de centrifugadas como descrito anteriormente, el sedimento se resuspendió en 50 ml de medio fresco conteniendo 0,55% de glucosa. En una de las muestras se añadió tunicamicina a una concentración final de 20 μ g/ml y ambas se crecieron en zaranda como se describió anteriormente. Se tomaron alícuotas a las 4 h, 8 h, 12 h, y 16 h, para determinación de actividad y *Western-blot*.

Western-blot

Se realizó básicamente según lo descrito por Towbin *et al.*, (1979). Como anticuerpo primario se utilizó un suero policlonal de conejo contra IFN α -2 rec. diluido 1/50 en una solución de Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM (TBS), conteniendo 5% de leche descremada (Oxoid). El suero se liberó de anticuerpos contra proteínas endógenas de levadura adicionando 300 g de proteínas del sobrenadante por cada 10 ml de la dilución del suero, incubándose primero 2 h a 42°C y luego 2 h a 40°C respectivamente. La detección se realizó utilizando proteína A marcada con 125 I (Burnette, 1981), empleando una actividad total de 5×10^6 cpm por filtro. Los patrones de pesos moleculares fueron: fosforilasa b (93 kDa); BSA (68 kDa); ovalbumina (43 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (21 kDa); β -lactoglobulina (18 kDa); y lisozima (14 kDa).

Actividad biológica del IFN

La actividad antiviral del IFN α -2 rec. en los sobrenadantes de los cultivos se expresó en Unidades Internacionales (UI), mediante la técnica de inhibición del efecto citopatogénico del virus Mengo en células Hep-2 de tumor laríngeo humano, comparándose con un estándar internacional de IFN (Barcelona, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSION

En un trabajo anterior, se demostró la utilidad del sistema de expresión del gen IFN α -2 rec. acoplado a la señal de secreción del factor y bajo el control del fragmento corto del promotor del gen de! GFD (de la Fuente *et al.*, 1988). No obstante, mediante el análisis por *Western-blot* de sobrenadantes de cultivos utilizando suero policlonal de conejo anti IFN α -2 rec., se encontró que, además de la banda de IFN que migraba en la talla correspondiente a 18 kDa, aparecían otras bandas a diferentes tallas, lo cual no correspondía con lo esperado (Fig.1). Con el fin de excluir la presencia de anticuerpos anti-levadura en el suero policlonal, éste fue absorbido con proteínas del medio de cultivo de la levadura que contiene el plasmidio de expresión sin el gen IFN. El suero

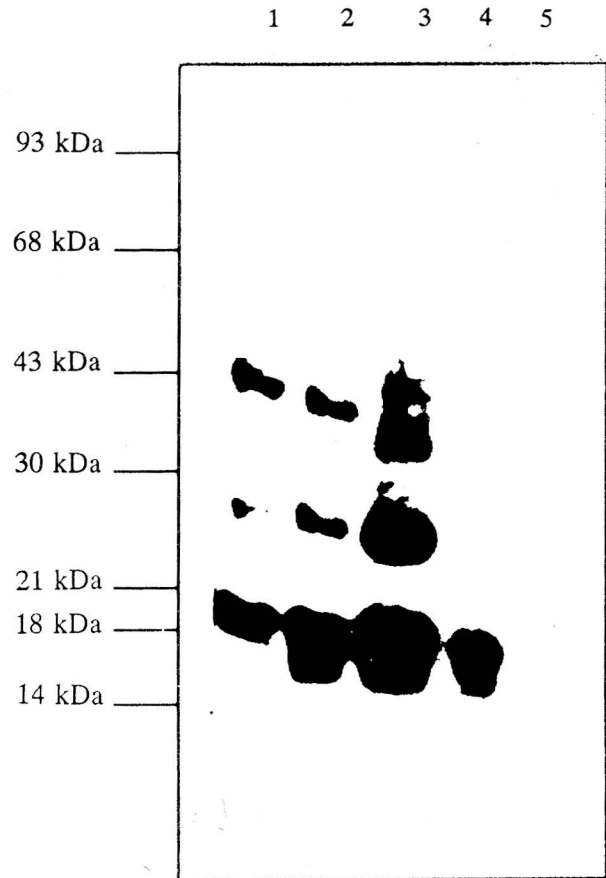


Fig. 1. Análisis por *Western-blot* de proteínas del sobrenadante concentrado de cultivo de *S. cerevisiae* secretora de IFN- 2 rec. Línea 1: 5 μ g. Línea 2: 10 μ g. Línea 3: 15 μ g. Línea 4: 2 μ g de IFN α -2 rec. de *E. coli*. Línea 5: 100 μ g de proteínas del sobrenadante de la levadura no transformada. Los patrones de pesos moleculares se indican.

obtenido no reconoció proteínas del medio extracelular de la levadura no transformada aún cuando se aplicaron cantidades de proteínas del sobrenadante muy superiores (Figura 1, línea 5).

Para otras proteínas heterólogas expresadas utilizando la señal de secreción del factor α en *S. cerevisiae* se han reportado patrones electroforéticos análogos. Este efecto se debía a la existencia en dichas proteínas de señales de glicosilación del tipo N (Miyajima *et al.*, 1986 y Livi *et al.*, 1990). Teniendo en cuenta estas evidencias, se decidió evaluar la presencia de glicosilación de este tipo en el IFN α -2 rec. aún cuando está reportado que esta proteína no presenta sitios de glicosilación del tipo N (Adolf *et al.*, 1991).

En la figura 2 se muestran los resultados del tratamiento del IFN α -2 rec. con la enzima Endo-H, que corta entre dos residuos N-acetilglucosamina de

Tabla 1.
Actividad de IFN-2 rec. en muestras del ensayo de inhibición de la glicosilación "in vivo" a diferentes tiempos.

Tiempo (h)	DO (+)	DO (-)	Actividad (+)	Actividad (-)
4	4,8	5,3	$5,1 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^5$
8	6,9	6,9	$4,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$
12	10,3	14,4	$2,2 \cdot 10^7$	$9,7 \cdot 10^6$
16	13,4	19,0	$2,2 \cdot 10^7$	$9,7 \cdot 10^6$

(+): Cultivo tratado con Tunicamicina. (-): Cultivo no tratado. La actividad de IFN se expresa en UI/ml de cultivo. La densidad celular del cultivo se expresa en unidades de densidad óptica DO a 600 nm. h: horas. Para detalles del experimento ver Materiales y Métodos.

los núcleos de oligosacáridos unidos a asparagina. En la línea 3, la proteína derivada del tratamiento mostró un incremento significativo en la movilidad electroforética respecto a la misma proteína no tratada (línea 2), lo cual es índice de desglicosilación. La eliminación de los oligosacáridos resultó en una molécula de talla aún superior al IFN α -2 rec. de *E.*

coli utilizado como control (línea 1 y 4 respectivamente). Para excluir la posibilidad de que dicho tratamiento no fue realizado con suficiente cantidad de enzima, se comprobó que estas condiciones fueron suficientes para desglicosilar la sacarosa-invertasa completamente (resultados no mostrados).

Como resultado de los experimentos mostrados en las figuras 1 y 2 pudiera explicarse que se está produciendo una molécula de IFN α -2 rec. procesada de forma incompleta con diferente grado de glicosilación del pro-factor α , el cual contiene tres sitios de glicosilación del tipo N (Kurjan y Herskowitz, 1982; Julius *et al.*, 1984). Este procesamiento incompleto puede ser debido a dos razones: la primera, que la proteína heteróloga se esté sobre-expresando en la célula de forma tal que exceda la capacidad catalítica de la enzima KEX-2, procesadora del precursor; la segunda razón pudiera estar relacionada con la estructura de la fusión

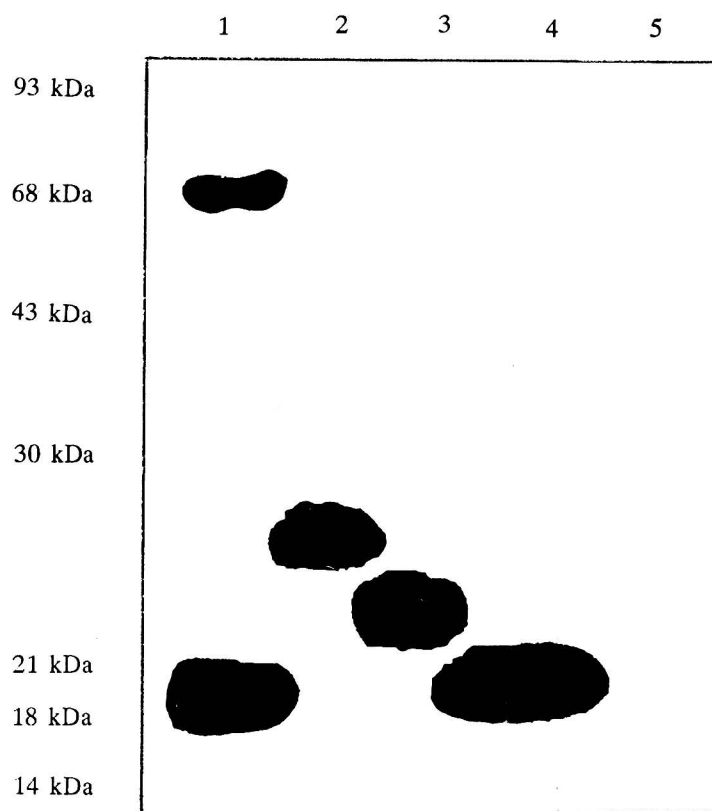


Fig. 2. Análisis por *Western-blot* del tratamiento con la enzima Endo-H. Línea 1: 2 g de IFN-2 rec. de *E. coli* no tratados (la banda de 68 kDa corresponde a albúmina humana empleada como preservativo). Línea 2: 4 g de proteínas del sobrenadante de *S. cerevisiae* secretora de IFN-2 rec. no tratados. Línea 3: Como en 2, pero tratados. Línea 4: 2 g de IFN-2 rec. de *E. coli* tratados. Línea 5: 20 g de proteínas del sobrenadante de la levadura no transformada. Los patrones de pesos moleculares se indican.

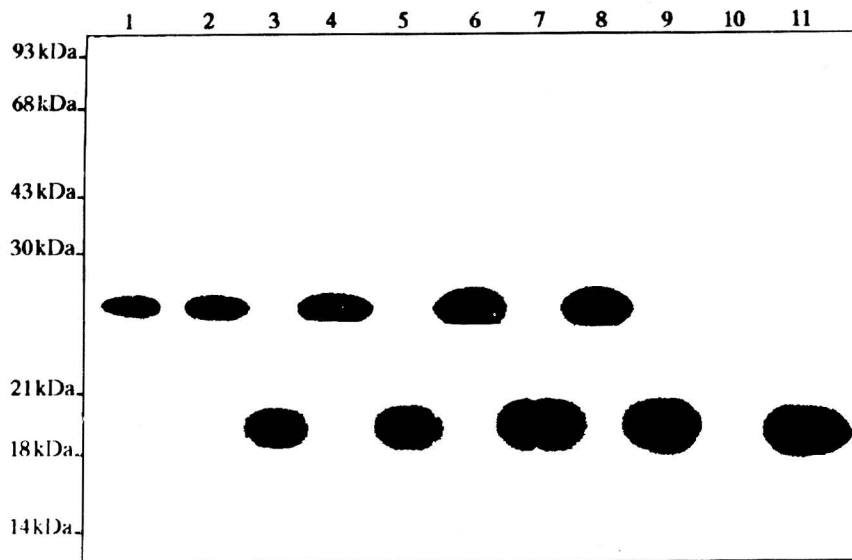


Fig. 3. Análisis por *Western-blot* del experimento de inhibición de la glicosilación "in vivo" utilizando el antibiótico tunicamicina. Las líneas 1, 2, 4, 6, y 8 corresponden a muestras (4 g de proteínas) tomadas a los tiempos 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, y 16 h del cultivo no tratado con el antibiótico. Las líneas 3, 5, 7, y 9 corresponden a muestras (4 g de proteínas) tomadas a las 4 h, 8 h, 12 h, y 16 h del cultivo conteniendo Tunicamicina. Línea 10: 20 g de proteínas del sobrenadante de la levadura no transformada. Línea 11: 4 g de IFN-2 rec. de *E. coli*. Los patrones de pesos moleculares se indican.

protéica (pro-factor α -IFN-2) en la zona de unión, la cual puede estar inhibiendo la accesibilidad a la proteasa KEX-2.

Efecto de la glicosilación sobre la actividad del IFN α -2 rec

Con el objetivo de obtener mayor información sobre la glicosilación del producto recombinante, el posible procesamiento incompleto de esta molécula expresada en *S. cerevisiae* y secretada al medio de cultivo, así como su efecto sobre la actividad biológica; se realizó un ensayo en el cual se creció la levadura en presencia del antibiótico tunicamicina, un conocido agente inhibidor de la glicosilación del tipo N "in vivo" (Snider *et al.*, 1984). Las muestras crecidas a diferentes tiempos en presencia de tunicamicina dieron un patrón de migración electroforético muy similar (Figura 3, líneas 3, 5, 7, y 9) al del control de IFN α -2 rec. de *E. coli* (línea 11), y distinto a su vez, del patrón de las mismas muestras crecidas en ausencia del antibiótico (líneas 1, 2, 4, 6, y 8). Estos resultados confirmaron la presencia de N-glicosilación, la cual pudiera estar asociada a la secuencia del pro-factor α . Por otro lado, en relación al procesamiento incompleto de la molécula recombinante, los resultados del experimento "in vivo" con la tunicamicina sugieren que la proteasa KEX-2 activa no esté funcionando por inaccesibilidad al sitio

de corte, como resultado del grado de glicosilación de la molécula pro-factor α -IFN α -2. En este sentido, luego del tratamiento, sula de IFN α -2 con talla similar al IFN α -2 de *E. coli* lo que significa que al inhibirse el proceso de glicosilación en un paso inicial de la ruta como es la transferencia de azúcares al transportador lipídico dolichol-P, para formar una unidad de oligosacárido-lípido que es donada a la proteína naciente en el retículo endoplasmático (Elbein, 1987), esto permita el procesamiento completo del producto recombinante. Esto no es sin embargo, lo que ocurre en el tratamiento "in vitro" con Endo-H, ya que según los resultados de la figura 2, en la línea 3 hubo un incremento en la movilidad electroforética después del tratamiento, lo cual es índice de desglicosilación pero en este caso se ha desglicosilado una molécula que ya había sido previamente procesada, lo cual pudiera explicar la diferencia aún existente en talla molecular entre las líneas 3 y 4 (~ 8 kDa equivalentes a la talla del pro-factor α). Por lo tanto, no es de esperar que se produzca una molécula de talla similar a la del IFN α -2 de *E. coli*.

No obstante las evidencias mostradas en este trabajo, otros autores han encontrado que algunas proteínas recombinantes entre las que se incluyen el IFN-Con1 y el Factor de Crecimiento de Transformación son ineficientemente procesados

"in vivo", siendo necesario introducir el gen KEX-2 en el mismo plasmidio de expresión de la levadura (Barr et al., 1987).

Por último, se evaluó la actividad IFN α -2 rec. en muestras de sobrenadantes de cultivos tomadas a diferentes tiempos, en presencia o no de la tunicamicina (Tabla 1). Como resultado, se encontró un menor crecimiento celular a partir de las 12 h en el cultivo con el antibiótico, sin embargo, se observó que la actividad biológica fue ligeramente superior en el cultivo que contenía la tunicamicina. Asimismo, por *Western-blot* se observó un reconocimiento discretamente superior de aquellas muestras provenientes de dicho cultivo (figura 3).

Experimentos posteriores de determinación de N-terminal y de secuencia por espectrometría de masa, permitirán elucidar que tipo de evento molecular está originando un procesamiento incompleto del precursor o si el producto recombinante está involucrado en otro proceso post-traducciona no detectable por las metodologías utilizadas en este trabajo.

Se puede concluir por tanto, que el IFN α -2 rec. expresado en la levadura *S. cerevisiae* se secreta glicosilado al medio de cultivo. Esta glicosilación, la cual pudiera estar asociada a un procesamiento incompleto del pro-factor es del tipo N, y la misma no tiene efecto sobre la actividad biológica del producto recombinante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. E. Pentón y al Lic. S. Pérez la valiosa colaboración técnica prestada durante la realización del trabajo.

REFERENCIAS

- Adolf, G. R.; I. Kalsner; H. Ahorn; I. Maurer-Fogy, and K. Cantell. (1991). Natural human interferon-alpha2 is O-glycosylated. *Biochem. J.* **276**: 511-518.
- Barcelona, S. (1983). Determinación de la actividad de interferón. Memorias del I Seminario Cubano sobre Interferón, La Habana, pp 47-51.
- Barr, P. J., H. L. Gibson, C. T. Lee, E. A. Sabin, M. D. Power, A. J. Braker, and J. R. Shuster. (1987). Heterologous gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the Alko Symposium on Industrial Yeast Genetics. Helsinki 1987.
- Burnette, W. N. (1981). Western-blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**:195-203.
- de la Fuente, J.; A. Herrera; A. Silva; S. Perez; M. Quintana; J. Delgado; J. Fernández, and L. Herrera. (1988). Expression and secretion of Alpha-2 IFN by *S. cerevisiae*. *Interferón y Biotecnología* **5**: 125-132.
- Elbein, D. A. (1987). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:497-534.
- Galzy, P. and 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**: 2423-2433.
- Huffaker, T. C. and P. W. Robbins. (1982). Temperature-sensitive yeast mutants deficient in asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **257**: 3203-3210.
- Julius, D., R. Scherkman, and J. Thorner. (1984). Glycosylation and processing of prepro-factor through the yeast secretory pathway. *Cell.* **36**: 309-318.
- Kurjan, J. and I. Herskowitz. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF): A putative -factor precursor contains four tandem copies of mature -factor. *Cell* **30**: 933-943.
- Lehle, L., R. E. Cohen, and C. E. Ballou. (1979). Carbohydrate structure of yeast Invertase. *J. Biol. Chem.* **254**: 12209-12218.
- Livi, G. P.; A. Ferrara; R. Roskin; P. L. Simon, y P. R. Young. (1990). Secretion of N-glycosylated human recombinant interleukin-1 alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **88**: 297-301.
- Miyajima, A.; K. Otsu; J. Schreurs; M. W. Bond, J. S. Abrams, and K. Arai. (1986). Expression of murine and human granulocyte-macrophage colony stimulating factors in *S. cerevisiae*: mutagenesis of the potential glycosylation sites. *EMBO J.* **5**: 1193-1197.
- Moir, D.T. and D.R. Dumais. (1987). Glycosylation and secretion of human alpha-1-antitrypsin by yeast. *Gene* **56**: 209-217.
- Pérez, G.; M. Quintana; Y. Quiñones; J. Vega, and C. Chuay (1990). Production levels of recombinant alpha-2 interferon by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotecnología Aplicada* **7**: 87-93.
- Silva, A.; J. de la Fuente; G. Pérez; Y. Quiñones; V. Jiménez; L. Novoa, and L. Herrera. (1988). High expression levels of human α -2 interferon gene under the control of lambda right promoter in *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* **5**: 40-45.
- Snider, M. D. (1984). Biosynthesis of glycoproteins: Formation of N-linked oligosaccharides. In Ginsburg, V. and Robbins, P. W. (Eds), *Biology of Carbohydrates*, Vol 2. Wiley, New York, pp 163-198.
- Stewart, W. E. II. (1980). In the Interferon system. Springer, New York.
- Towbin, H.; T. Stehelin, and J. Gordon. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354