

PROCESAMIENTO DEL PRODUCTO DEL GEN *pol* DEL VIH-1 EN *Saccharomyces cerevisiae*

Carlos A. Sariol¹, Gerardo Ferbeyre², Ignacio. Ruiball³, Jorge Aguiar², Eugenio Palmeiro³, Juan Morales-Grillo².

¹Instituto de Medicina Tropical, Pedro Kourí, Apartado 601, Marianao 13, La Habana, Cuba. ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba ³Laboratorio Nacional de Referencia del SIDA, Apartado 23031, La Habana, Cuba.

Recibido en mayo de 1992. Aprobado en septiembre de 1993^a

Key words: *Saccharomyces*, HIV, Reverse Transcriptase, gen *pol*, Protease.

SUMMARY

The gene *pol* of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* under promoter of glyceraldehyde phosphate deshydrogenase (GAPD). The construction includes the protease domain, the reverse transcriptase, and the endonuclease, as well as, 696 pb corresponding to the gene *vif*. The product was studied by Western blot, electronic immunomicroscopy and its biological activity was estimated. Results shown that a soluble protein is obtained partially processed, with reverse transcriptase activity.

RESUMEN

El gen *pol* del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se expresó en *Saccharomyces cerevisiae* bajo el promotor del gen que codifica la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPD). La construcción incluye los dominios de la proteasa, la transcriptasa inversa y la endonucleasa, así como 696 pb correspondiente al gen *vif*. El producto se estudió por Western blot, inmunomicroscopía electrónica y se le estimó la actividad biológica. Los resultados demuestran que se obtiene una proteína soluble parcialmente procesada con actividad de transcriptasa inversa.

INTRODUCCION

Desde el descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) como agente causal del SIDA (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983) se han acometido diversas estrategias para su control (Richman, 1991), entre ellas, una de las más trabajadas ha sido el uso de inhibidores de la transcriptasa inversa, enzima que es vital para el ciclo replicativo del virus y por tanto un blanco atractivo para la búsqueda de nuevos agentes con fines terapéuticos, entre ellos encontramos análogos de algunos nucleósidos como la 3' ácido-3'deoxitimidina y la 2',3' dideoxiinosina (Mitsuya y Broder, 1986; Richman, 1991), así como extractos de especies marinas (Loya y Hizi, 1990) y otros (Merluzzi *et al.*, 1990).

Para el estudio de estos inhibidores se hace necesario disponer de la transcriptasa inversa, pero su obtención de fuentes naturales, a partir de viriones, es riesgosa y se encuentra en bajas concentraciones, por lo que se han abordado diversas formas para su expresión en bacterias (Tanese *et al.*, 1986), levaduras (Barr *et al.*, 1987), células de mamíferos (Peng *et al.*, 1991), o utilizando baculovirus (Yu Weng and Yong Kang, 1991) y virus vaccinia como vectores (Flexner *et al.*, 1988).

De manera natural Pol se produce como una gran poliproteína fusionada al producto del gen *gag* (pr160) a manera de precursor, posteriormente, la proteasa viral, que ocupa el dominio amino terminal de *pol*, se autoescinde (p14) (Kohl *et al.*, 1988) y finalmente completa el procesamiento de la transcriptasa inversa (p66/51) y la endonucleasa (p32) como proteínas independientes (Veronese *et al.*, 1986).

En este trabajo se reporta el procesamiento del gen *pol* en *Saccharomyces cerevisiae* y la expresión de una proteína soluble con actividad de transcriptasa inversa.

MATERIALES Y METODOS

Las enzimas de restricción y modificación, así como la T4 DNA Ligasa utilizadas procedían de Enzibiot-HEBER BIOTEC, la CIP de SIGMA (USA), Poly (rA)-Olygo (dT)₁₂₋₁₈ de Pharmacia L.K.B. Biotechnology Inc., Piscataway Y, N.J. y [³H] TTP de Amersham International, Amersham, U.K.

Construcción del Vector de expresión

Todas las manipulaciones del DNA se realizaron según Sambrook *et al.* (1989).

Para la construcción del vector de expresión se utilizó un fragmento BglIII/Sall de un plasmidio que contiene el genoma completo del HIV-1 (Ratner *et al.*, 1985).

El corte BglII delecta los primeros cuatro aminoácidos del gen *pol* localizados en la región del **frameshifting** *gag/pol* (Wilson *et al.*, 1988) y que se corresponde con el extremo amino terminal de la proteasa, siendo la secuencia Phe-Phe-Arg-Glu-Asp, de forma tal que el ATG es seguido del Asp que ocupa la quinta posición en la secuencia anterior, conservándose así el marco de lectura. En el caso del extremo C-terminal, el sitio Sall se encuentra 696 pares de bases después del codón de parada de Pol (TAG), dentro de la secuencia del gen *vif*.

Este fragmento fue subclonado en un vector de levaduras que contiene el promotor y el terminador del gen de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPD) (Torrens *et al.*, 1989) (figura 1), conformándose el plasmidio pBSJG. Luego, un cassette de expresión BamHI, que incluye el promotor, el gen *pol*, el fragmento del gen *vif* y el terminador GAPD (GAP-T), fue purificado y subclonado en otro vector de levaduras que tiene sitio de origen de la replicación y los marcadores de selección URA-3 y LEU-2 propios para el trabajo en estos microorganismos (Torrens *et al.*, 1989) (figura 2), obteniéndose los plasmidios pBSDC 8, 16 y 21. El pBSDC-8 fue seleccionado posteriormente para estudiar la expresión en levaduras.

Células.

Se utilizó la cepa bacteriana XL-1-Blue (Bullok *et al.*, 1987). Para todas las manipulaciones, se procedió de acuerdo a los métodos estándar (Sambrook *et al.*, 1989). La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fue la SEY 2201 (α , *leu* 2-3,112, *ura* 3-52, *can* 1-101) y se transformó por un método rápido descrito por Barker (1991).

Condiciones de crecimiento.

Las células fueron cultivadas con agitación a 250 rpm y temperatura de 28°C en una zaranda (modelo g-25, New Brunswick Scientific Co. Inc.), en 200 ml de medio mínimo GO (Galzy y Sloninsky, 1957) complementado con 2% de glicerol y 0.1% de hidrolizado ácido de caseína, durante 24 h, luego se suministró glucosa al 2% y extracto de levaduras al 0.3 % cada 24 h hasta completar 96 h.

Procedimiento de ruptura.

Las células procedentes de 200 ml de cultivo fueron aisladas por centrifugación a 3500 rpm y 4°C de temperatura, se lavaron con solución tampón de lisis conteniendo 50 mM de Tris/Hcl pH 8.0, 62.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, y 1 mM de PMSF, según Bathurst *et al.* (1990), a continuación se rompieron utilizando perlas de vidrio (0.25-0.5 mm de diámetro) en un equipo de vibraciones (Braun, GFR) durante 8 min.

Purificación y cuantificación de la Proteína.

La purificación de la proteína se realizó por precipitación con sales de sulfato de amonio y a continuación las fracciones procedentes de la precipitación se pasaron por una columna Whatman P-11 siguiendo la metodología descrita por Bathurst *et al.* (1990). En todos los casos para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976). Las electroforesis de proteínas se realizaron según método descrito (Laemmli, 1970) y el Western blot según Burnette (1976).

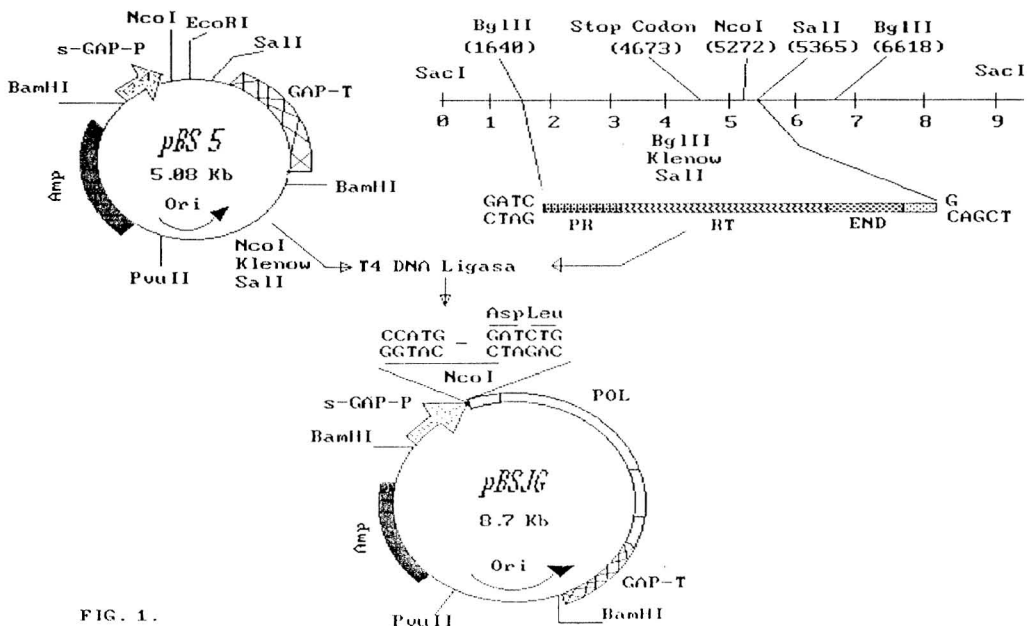


FIG. 1.

Fig. 1. Estrategia de clonación del gen *pol*. El gen *pol* con el fragmento del gen *vif* fusionado a su extremo C-terminal fue insertado en el pBS 5, generándose un sitio *NcoI* en la unión del promotor con *pol*, conservando la trama de lectura de este último inmediatamente después del ATG (Para detalles ver el texto). Abreviaturas: S-GAP-P:Short GAP promotor, GAP-T:GAP terminator, PR:proteasa, RT:transcriptasa inversa, END: endonucleasa, Ori:origen de replicación.

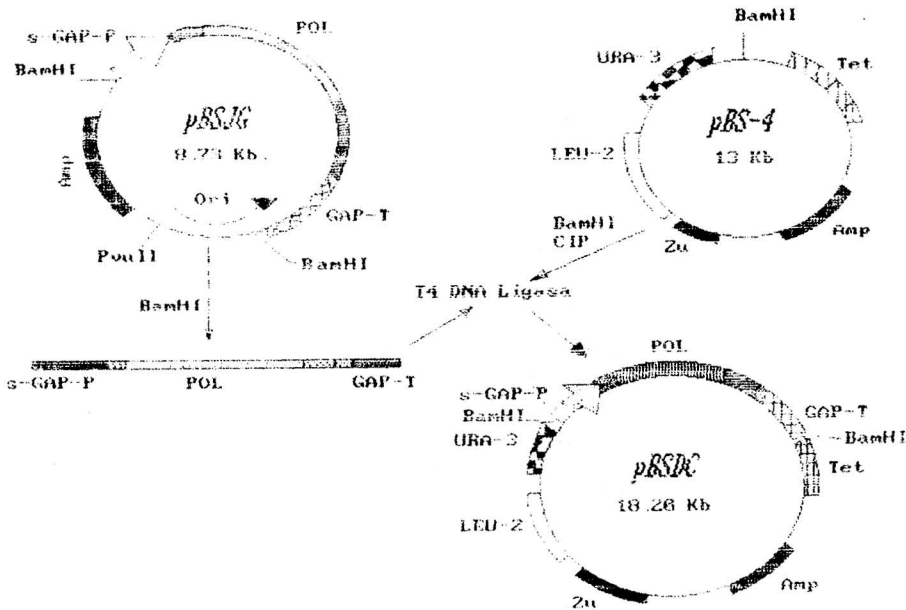


FIG. 2.

Fig. 2. Subclonación del gen *pol* en un vector de expresión en levaduras. Un cassette de expresión BamHI, conteniendo el promotor de la GAPD (S-GAP-P), el gen *pol*, y el terminador de la transcripción del mismo sistema (GAP-T), fue insertado en el plasmidio pBS-4 para conformar el plasmidio pBSDC-8. Para detalles consultar el texto. Abreviaturas: URA-3: marcador de selección para uracilo Leu-2: marcador de selección para leucina.

Ensayo de Transcripción inversa

El ensayo de transcripción inversa fue realizado esencialmente de acuerdo a un método publicado previamente (Hoffman *et al.*, 1985).

Microscopía Electrónica

El procesamiento para el marcaje inmunocitoquímico se realizó acorde a Garzon *et al.* (1982) y Bendayan (1984).

Para la visualización se utilizó un Microscopio electrónico JEOL-JEM-2000 a una aceleración de voltaje de 80 kV.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 3, en la columna B, se puede observar una banda con una talla de 68 Kd, identificada por Western blot, utilizando el suero de un paciente con SIDA procedente del banco de sueros del Laboratorio Nacional de Referencia del SIDA (DAVIH) y que se corresponde con el producto expresado por la levadura transformada con el plasmidio pBSDC-8.

Anteriormente Kramer *et al.* (1989), reportaron la presencia de una proteína de igual talla (68 Kd), al expresar el segmento genómico *gag/pol* en *Saccharomyces cerevisiae*, sin poder demostrar los productos del procesamiento del gen *pol* con sus tallas correspondientes, es decir, la transcriptasa inversa (66/51), la proteasa (p14) y la endonucleasa (p32), lo que atribuyeron a un fallo en la maquinaria enzimática

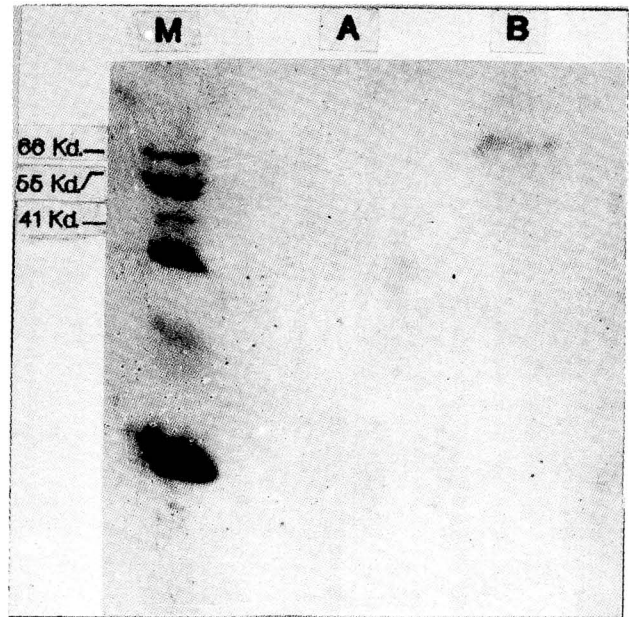


Fig.3. Western blot. El patrón utilizado fue un antígeno purificado a partir de cultivo celular, que expresa constitutivamente el VIII. El Western blot fue realizado utilizando el sobrenadante de ruptura. M: antígeno VIII. A: control negativo. B: sobrenadante procedente de la levadura transformada con el plasmidio pBSDC-8.

de la levadura en el procesamiento del ARN a partir del **frameshifting**, y al hecho de que se produce 20 veces más de los productos de Gag que de los derivados de Pol por este mecanismo.

En nuestro trabajo, la ausencia de los productos de Pol con sus tallas correctas, podría atribuirse a la gran actividad proteolítica reportada por varios autores (Graves *et al.*, 1988; Hostomski *et al.*, 1989; Piedimonte *et al.*, 1990), cuando se expresa la proteasa viral en cantidades superiores a las que habitualmente se producen como consecuencia del ciclo de vida del virus, ocasionando la degradación de varias proteínas celulares e incluso de las virales (Krausslich, 1991), lo que es de esperar en nuestra construcción, ya que la región que codifica para la proteasa, es la primera en transcribirse a partir del gen *pol*. En nuestro sistema, ese efecto tóxico, puede ser reflejado por la diferencia en la curva de crecimiento de las levaduras transformadas con el pBSDC-8 y las transformadas con el pBS-4 (figura 4A y Tabla 1), además de la presencia de una destrucción nuclear, detectada por microscopía electrónica, del clon que expresa la poliproteína (Sariol *et al.*, 1992) y que pudiera estar en relación con el mismo efecto.

Con relación a la talla de 68 KDa del producto identificado por el western blot, teniendo en cuenta que la construcción genética no incluye la región del **frameshifting**, no encontramos una explicación clara para el mismo, aunque su procesamiento pudiera verse afectado por el aumento de la actividad proteolítica, de todas formas deben realizarse estudios posteriores para la mejor caracterización de este fenómeno.

Por otra parte, esa misma banda no se pudo identificar por tinción de las electroforesis de proteínas con nitrato de plata o azul de Coomassie, ya sea con muestras provenientes de las precipitaciones con sulfato de amonio o de las fracciones eluidas de la columna Whatman P-11 (datos no mostrados).

Sin embargo, los ensayos de transcripción inversa arrojaron una actividad polimerásica en el clon positivo (figura 5) demostrando que la proteína obtenida conserva actividad biológica, sobre todo en las muestras tomadas de la precipitación al 30% con sulfato de amonio y de

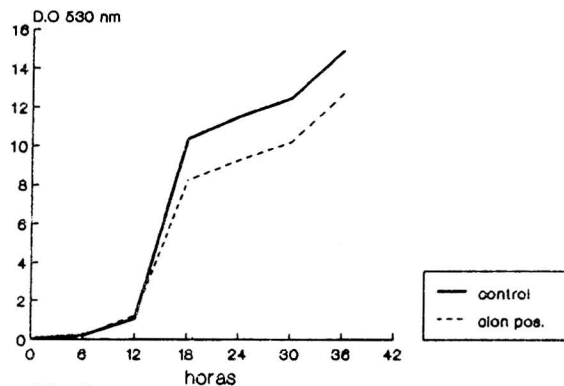


FIG. 4A.

Fig. 4. Curva de crecimiento. En A la curva de línea gruesa indica el crecimiento de la levadura control, mientras la fina indica el de la transformada con el plasmidio pBSDC-8. A partir de las 18 h, luego de una fase de crecimiento exponencial para ambas levaduras, se puede apreciar como la transformada con el pBSDC-8 no llega nunca a los niveles de DO del control. Los valores constituyen el resultado de cinco experimentos en los que en cada tiempo se realizaron 5 determinaciones independientes cuyos promedios se ilustran en la Tabla 1, encontrándose una diferencia significativa de $p < 0.05$ desde las 18 h de crecimiento en adelante. La densidad óptica (DO) fue medida en fotocolorímetro (CIBA CORNING Colorimeter 257).

Tabla 1
Valores de DO medidos durante 36 horas de crecimiento*

Horas	Lev. con pBSDC-8	Lev. con pBS-4
18	8.248 ± 0.267	10.350 ± 0.372
24	9.289 ± 0.547	11.538 ± 0.273
30	10.179 ± 0.269	12.460 ± 0.479
36	12.682 ± 0.247	14.891 ± 0.491

Sólo los valores con $p < 0.05$

la fracción No. 3 eluída de la columna de fosfocelulosa. En el resto de las fracciones la actividad registrada no revasó los valores de fondo determinados para el control negativo (datos no mostrados).

Esa relación, dada por una ausencia de bandas en las tinciones de las electroforesis de proteínas y la presencia de actividad de transcriptasa inversa, ha sido reportada en construcciones similares en bacterias (Tanese *et al.*, 1986). Por otra parte, utilizando vaccinia virus como vector para expresar el segmento

* Presentado en el Congreso de Biotecnología, Habana, Junio, 1992, Cuba.

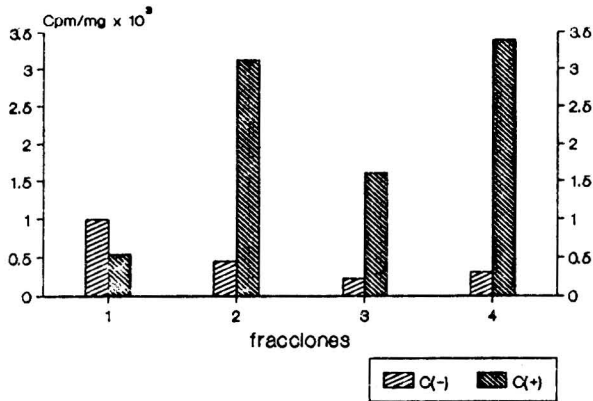


Fig. 5. Resultado del ensayo de transcripción inversa. En la fracción 1 se muestran los resultados obtenidos en el sobrenadante de ruptura, en 2 y 3, los estimados para las fracciones procedentes de la precipitación con sulfato de amonio al 30 y al 50% respectivamente, en 4, se señala la actividad registrada de la muestra eluída en la fracción No. 3 de la columna Whatman P-11 y que provenía de la precipitación al 30% con sulfato de amonio, donde se obtuvieron los valores más altos de actividad específica. Clon positivo: levaduras transformadas con el plasmidio pBSDC-8. Control negativo: levaduras transformadas con el plasmidio pBS-4.

genómico *gag/pol* se logró un procesamiento de la poliproteína evidenciado por inmunoblot, sin embargo, no se detectó la actividad polimerásica (Flexner, 1988), reportándose en baculovirus resultados análogos, planteando los autores que la ausencia de actividad podía ser debido a dificultades en lograr una estructura tridimensional correcta de la proteína.

Otro factor referido en este último trabajo y como explicación del fenómeno anterior, es el efecto tóxico de la proteasa viral, mencionado anteriormente en este trabajo, el cual afecta la expresión de la poliproteína heteróloga. Con el objetivo de conocer la localización de la proteína dentro de la célula de levadura, se realizó un experimento de inmunomicroscopía electrónica usando el mismo suero positivo. Se puede observar un marcaje sin localización específica, sugiriendo que el producto obtenido se sintetiza como una proteína libre en el citoplasma y no particulada (figura 6).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podemos decir que el producto del gen *pol* se sintetiza en *Saccharomyces cerevisiae* como una proteína soluble, parcialmente procesada, pero conservando su actividad biológica de transcriptasa inversa. El nivel de expresión pudiera ser mejor si se eliminara el dominio de la proteasa, puesto que es probable que la diferencia en la curva de

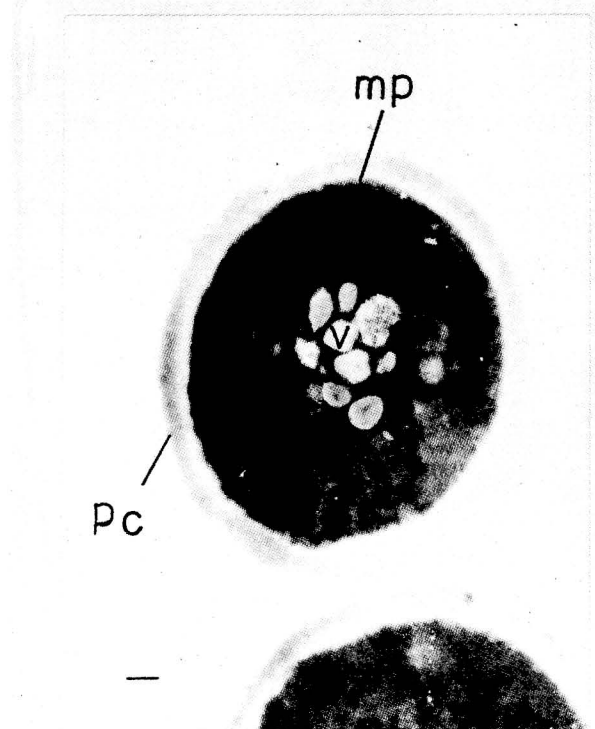
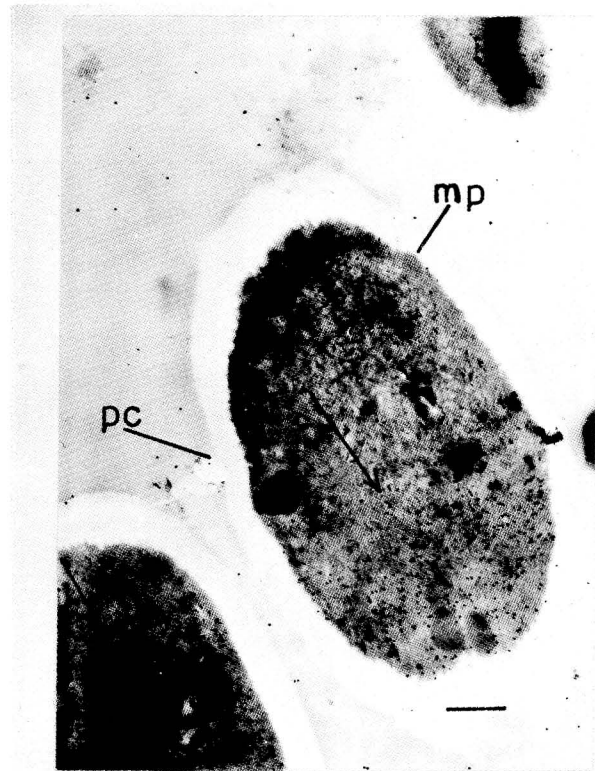


Fig. 6. Inmunomicroscopía electrónica. En A se observa la levadura que expresa el producto del gen *pol* y en B la levadura transformada con el pBS-4. Las flechas indican la presencia del marcaje descrito en el texto. (Magnificación: 20K y aceleración de 80 Kv). Abreviaturas: pc: pared celular, mp: membrana plasmática.

crecimiento de la levadura transformada con el pBSDC-8 con relación al control se deba a su efecto tóxico. Como se evidencia *Saccharomyces cerevisiae* sigue siendo un huésped útil como sistema para la expresión de proteínas virales recombinantes.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los compañeros de la División de Enzimas del CIGB y en especial al Lic. A. Suárez, por sus acertadas orientaciones, a la Dra. V. Falcón y a N. Baranosky por el excelente trabajo de microscopía, al Lic. V. Vázquez y a R. Pierrat por su asistencia técnica en la computadora, así como a la Dra. S. Resik y al Dr. J.L. Maestre por sus observaciones críticas en la confección de este manuscrito.

REFERENCIAS

- BARKER, R. (1991). Rapid colony transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Ac. Reser.* **19**:1945.
- BARRE-SINOUSI, F.; J.C. CHERMANN; F. REY; M.T. NUGEYRE; S. CHAMRET; J. GRUEST; C. DAUGUET; C. AXLER-BLIN; F. VEZINET-BRUN; C. ROUZIOUX; W. ROSEMBAUM; and L. MONTAGNIER (1983). Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Science* **220**:868-871.
- BARR, P.J.; M.D. POWER; C. TING LEE-NG; H.L. GIBSON; and P.A. LUCIW (1987). Expression of active human immunodeficiency virus reverse transcriptase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/technology*. **5**:486-489.
- BATHURST, I.C.; L.K. MOEN; M.A. LUJAN; H.L. GIBSON; P. H.FEUCHT; S. PICHUANTES; C.S. CRAIK; D.V. SANTI and P.J.BARR (1990). Characterization of the human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase enzyme produced in yeast. *Bioch. and Bioph. Research. Commun.* **171**:589-595.
- BENDAYAN, M (1984). Protein-gold electron microscopic immunocytochemistry methods, applications and limitations. *J. Electr. Microsc. Tech.* **1**:243-270.
- BRADFORD, M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- BULLOK, W.O.; T.M. FERNANDEZ; and J.M. SHOTE (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *rec A Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. *Biothec.* **5**:376-379.
- BURNETTE W.N. (1981). Western Blotting: Electroforesis transfer of protein from sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein. *A Analyt Biochem.* **112**:195-203.
- FLEXNER, C.; S.S. BROYLES; P. EARL; S. CHAKRABARTI; and B. MOSS (1988). Characterization of human immunodeficiency virus gag/pol gene product expressed by recombinant vaccinia virus. *Virology.* **166**:339-349.
- GALLO R.C.; P.S. SARIN; E.P. GELMANN; M. ROBERT-GUROFF; E. RICHARDSON; V.S. KALYANARAMAN; D. MANN; G.D. SIDHU; R.E. STAHL; S. ZOLLA-PAZNER; J. LEIBOWITZ and M. POPOVIC (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-868.
- GALZY, P. and P.P. SLONINSKI (1957). Variation physiologique de la levadure au cours de la croissance sur acide lactique comme seule source de carbone. *Comptes. Rends. Acad. Sci. (Paris)* **245**:2423-2433.
- GARZON, S.; M. BENDAYAN; and E. KURSTARK (1982). Ultrastructural localization of viral antigens using protein-A gold technique. *J. Virol. Meth.* **5**:67-63.
- GRAVES, M. C.; J.J. LIM; E.P. HEIMER and R.A. KRAMER (1988). An 11 Kd from HIV protease expressed in *E. coli* is sufficient for enzymatic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA* **85**:2449-2453.
- HOFFMAN, A.D.; B. BANAPOUR and J.A. LEVY (1985). Characterization of the AIDS-associate retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology* **147**:326-335.
- HOSTOMSKI, Z.; K. APPELT and R.C. OGDEN (1989). High level expression of cell-processed human immunodeficiency virus protease in *E. coli* using a syntetic gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**:1056-1063.
- KOHL, N.E.; E.A. EMINI; W.A. SCHLEIF; L.J. DAVIS; J. C. HEIMBACH; J.C. DIXON; R.A.F. SCOLNICK and I.S. SIGALY (1988). Active HIV protease is required for viral p1p- infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:4686-4690.
- KRAMER, R.A.; M.D. SCHABER; A.M. SKALKA; K. GANGOLY; F. WONG-STAAAL and E.P. REDDY (1985). HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease. *Science* **231**:1580-1584.
- KRAUSSLICH, H.G. (1991). Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the virus polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3213-3217.
- LAEMMLI, U.K., (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
- LOYA, S. and A. HIZI (1990). The inhibition of Human Immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by Avarol and Avarone derivatives. *FEBS Lett.* **269**:131-134.
- MERLUZZI, V.J.; K. GROZINGER; M. SKOOG; J.C. WU; C.K. SHIM; K. ECKNER; S. HATTOX; J. ADAMS; A.S. ROSETHAL; R. FAANES; R.J. ECKNER; R.A. KOUF and J.L. SULLIVAN (1990). Inhibition of HIV-1 replication by a non nucleoside reverse transcriptase inhibition. *Science.* **25**:1411-1413.
- MITSUYA, H. and S. BRODER (1986). Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of HTLV III/LAV by 2',3'-dideoxynucleosides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **83**:1911-1915.
- PENG, C.; N.T. CHANG; and T. WEN CHANG (1991). Identification and characterization of human immunodeficiency virus type 1 gag/pol fusion protein in transfected mammalian cells. *J. Virol.* **65**:2751-2756.
- PIEDIMONTE G.; P.G. PETRONINI.; D. GUETARD.; V. FARIER.; A.F. BORSHETTI.; and L. MONTAGNIER (1990). Protease activation during HIV infection in a CD4-positive cell line. *AIDS Res. Human retrovirus.* **6**:251-260.

- RATNER, L.; W. HASELTINE; R. PATARCA; K.J. LIVAK; B. STARCICH; S.F. JOSEPHS; E.L. DORAN; J.A. RAFALSKI; E.A. WHITEHORN; K. BAUMEISTER; L. IVANOFF; S. R. PETTEWAY Jr.; M.L. PEARSON; J.A. LAUTENBERGER, T.S. PAPAS, J. GHAYEB; N.T. CHANG; R.C. GALLO; and F. WONG-STAAAL (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV III. *Nature* (London) **313**:275-284.
- RICHMAN, D. (1991). Antiviral therapy of HIV infection. *Annu. Rev. Med.* **42**:69-90.
- SAMBROOK, J.; E.F. FRITSCH; and T. MANIATIS (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. edition. Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- TANESE, N.; J. SODROSKI; W.A. HASELTINE; and S.P. GOFF (1986). Expression of R.T. actvity of Human T-Lymphotropic virus type III in *E. coli*. *J. Virol.* **59**:743-745.
- TORRENS, I.; A. VILLEGAS; R. NARCIANDI; A. SANTOS; F. RODRIGUEZ; J. MORALES; A. SILVA; L. HERRERA (1989). La fusión de los genes superóxido dismutasa humana y la proquimosina de ternero se expresa eficientemente en *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotecnología Aplicada* **7**:257-264.
- VERONESE, F.D.M.; T.D. COPELAND; A.L. DE VICO; R. RAHMAN; S. OROSZLAN; R.C. GALLO; and M.G. SARNGADHARAM (1986). Characterization of highly immunogenic p66/51 as the re reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* **231**:1289-1291.
- WILSON, W.; M. BRADDOCK; S.E. ADAMS; P.D. RATHJIN; S.M. KINGSMAN; and A.J. KINGSMAN (1988). HIV expression strategies: Ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast system. *Cell* **55**:1159-1169.
- YU-WEN HU; and C. YUNG KANG (1991). Enzymes activities in four different forms of human immunodeficiency virus 1 pol gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:4596-4600.