



PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRODUZIDAS EM LEVEDURAS

Fernando Araripe Gonçalves Torres

PhD, Professor Adjunto do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.
ftorres@unb.br

Lídia Maria Pepe de Moraes

PhD, Professora Adjunta do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília
lmoraes@unb.br

Considerações sobre o uso de leveduras para a expressão de proteínas de interesse econômico

Fotos cedidas pelos autores

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são fungos que têm sido utilizados pelo homem há milhares de anos e cuja manipulação causou um grande impacto na produção de alimentos e, por conseguinte, influenciando o próprio processo de desenvolvimento sócio-econômico da humanidade. O pão, a cerveja e o vinho representam os produtos mais expressivos do processo de manipulação desses microrganismos ao longo do tempo. Em todos esses processos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve um papel de destaque. Além de ser considerada um dos microrganismos mais úteis ao homem, essa levedura é um dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos. Sua genética é bem dominada e seu genoma foi totalmente sequenciado, fato este que representou uma das maiores conquistas da Biologia no século XX. Após o advento da tecnologia do DNA recombinante, a levedura *S. cerevisiae* pôde ser empregada em estudos de genética molecular a partir do final dos anos 70, quando ela foi geneticamente transformada pela primeira vez. Desde então, vários tipos de vetores moleculares foram desenvolvidos, inclusive cromossomos artificiais, mais conhecidos como YAC (“Yeast Artificial Chromosomes”). Com a obtenção de cepas de leveduras mutantes foi possível o isolamento de genes de outros organismos eucarióticos por complementação. Nos últimos anos, foi desenvolvida em *S. cerevisiae* uma das mais sofisticadas abordagens para a identificação de genes interativos. Trata-se de uma técnica conhecida como sistema duplo-híbrido ou “two hybrid”, que propiciou a identificação de vários genes envolvidos em vias de transdução de sinal e no ciclo celular.

No campo da pesquisa aplicada, a levedura *S. cerevisiae* logo se destacou

como um interessante candidato para a expressão de genes heterólogos de interesse biotecnológico. Embora a bactéria *Escherichia coli* represente uns dos mais

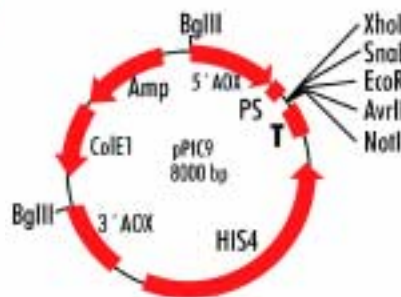


Figura 1: Mapa do plasmídeo pPIC9. Apenas os sítios de restrição mais relevantes estão indicados. 5'AOX: região promotora do gene AOX1; PS: peptídeo sinal do fator α ; T: região terminadora da transcrição; HIS4: marca de seleção para *Pichia*; 3'AOX: fragmento 3' do gene AOX1; ColE1: origem de replicação bacteriana; Amp: marca de seleção para *E. coli*

poderosos sistemas de expressão heteróloga, várias proteínas eucarióticas de interesse comercial não puderam ser expressas eficientemente nesse microrganismo. Entre as razões para esses insucessos poderíamos citar: conformação incorreta, ausência de modificações pós-traducionais e baixos níveis de expressão. Alguns desses problemas puderam ser resolvidos quando as mesmas proteínas foram expressas em *S. cerevisiae*. O ambiente intracelular da levedura é adequado para a ocorrência de várias reações que normalmente ocorrem em células de mamíferos.

Além do mais, *S. cerevisiae* goza do status de microrganismo “GRAS” (Generally Recognized As Safe) o que é de suma importância no que se refere à produção de biofármacos por engenharia genética. No entanto, várias proteínas humanas sofrem hiperglicosilação quando secretadas por *S. cerevisiae* o que será discutido mais adiante.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris*

Ao longo das últimas duas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Entre esses novos sistemas, destaca-se *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica, ou seja, que é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. O fato de crescer até alta densidade celular em um meio barato levou a empresa Phillips Petroleum Company a propor o uso dessa levedura como fonte de alimento (“single cell protein” - SCP). Após constatar que o processo de produção de SCP era inviável economicamente, a empresa decidiu transformar *P. pastoris* em um sistema de produção de proteínas recombinantes.

A levedura *P. pastoris* apresenta duas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira, é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris*. Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promoto-

res glicolíticos, o promotor *AOX1* é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. Uma vez que a maioria das proteínas heterólogas são de alguma forma deletérias para a célula, quando expressas em altos níveis, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Trata-se de uma importante precaução para minimizar a seleção de mutantes que não expressam o produto heterólogo durante o crescimento da cultura. Para ser ativado, o promotor *AOX1* requer a presença de metanol e, na ausência desse indutor, ele se torna reprimido. Além de metanol, o sistema *AOX1* necessita da ausência de glicose para ser plenamente ativado. Uma vez que o promotor *AOX1* é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores.

A segunda característica importante de *P. pastoris* é que esta levedura não é considerada uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae*. A fermentação realizada por leveduras gera etanol, o qual, em culturas de alta densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos (“efeito Crabtree”). Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células. É necessário, pois, atingir níveis de alta densidade celular os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae*. Em contraste, as cepas produtoras de *P. pastoris* são facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores.

Vários genes de diferentes procedências (bactérias, fungos, invertebrados, plantas e humanos) já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle do promotor *AOX1*. A maioria dos genes expressos tiveram seus produtos secretados para o meio extracelular e alguns, como o fator de necrose tumoral humano, foi produzido no ambiente intracelular. Os vetores de expressão em *P. pastoris* são geralmente do tipo integrativo. Esses vetores possuem um cassete de expressão formado pelo promotor e pela região terminadora de transcrição do gene *AOX1* além de uma marca de seleção, sendo a mais utilizada o gene histidinol desidrogenase (*HIS4*) de *P. pastoris*. Essa marca permite a seleção de transformantes prototróficos *His⁺* a partir de uma linhagem hospedeira *his4⁻*. Um dos vetores mais utilizados é o plasmídeo pPIC9 (Figura 1) desenvolvido e patentado pela empresa Invitrogen. O gene de interesse é clonado

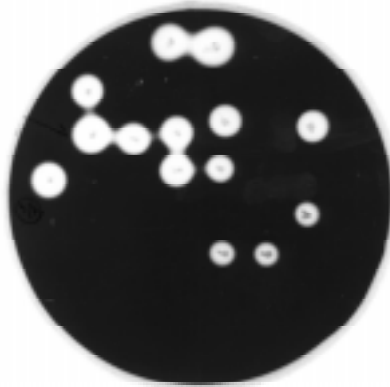


Figura 2: Análise da expressão de clones de *P. pastoris* (protease positiva) transformada com o cassete de expressão contendo a fusão α amilase-glucoamilase. Os clones foram inoculados em meio contendo amido que foi, então, corado com vapor de iodo após crescimento das colônias. Notar os diversos tamanhos dos halos de hidrólise que correspondem a clones com diferentes números de cópias do cassete de expressão

na região do cassete de expressão em um dos sítios de clonagem que se localizam logo após o sinal de secreção, nesse caso, o peptídeo sinal do fator α de *S. cerevisiae*. O cassete de expressão é liberado pela digestão do plasmídeo com a enzima de restrição *Bgl*II, e uma cepa *his4⁻* de *P. pastoris* é transformada por eletroporação. Como em *S. cerevisiae*, o DNA linearizado pode gerar transformantes estáveis quando se integra no genoma por recombinação homóloga. Esses transformantes podem se originar pela integração do cassete de expressão tanto no locus *AOX1* quanto no *his4⁻*. No primeiro caso, pode haver uma substituição completa do gene *AOX1* pelo cassete de expressão, o que resulta em um fenótico denominado *Mut^s*, caracterizado por um crescimento lento na presença de metanol. Ocasionalmente, o cassete de expressão pode se integrar várias vezes no locus *AOX1*, o que pode ser confirmado por análise de “Southern blotting”. Outros vetores, semelhantes ao pPIC9, não possuem sinais de secreção e, portanto, são empregados para a expressão intracelular. Existem variantes do pPIC9 que não possuem o sinal de secreção no cassete de expressão sendo, portanto, ideais para expressão intracelular.

Embora muito utilizados, os vetores descritos anteriormente têm como desvantagens o grande tamanho (cerca de 8 Kb) e a presença de poucos sítios de restrição para a clonagem do gene heterólogo. Há uma família de vetores de *P. pastoris* que

contém o gene *Sb ble*, que confere resistência à droga zeocina tanto em *E. coli* quanto em *P. pastoris*. Embora esses vetores sejam bem menores que o pPIC9, o preço proibitivo da droga de seleção inibe o uso desse sistema em escala industrial. Recentemente, novos plasmídios com promotores alternativos se tornaram disponíveis. Esses vetores contêm o promotor *GAP*, um forte promotor constitutivo derivado do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAP*). Em culturas crescidas em glicose, os níveis de expressão obtidos pelo promotor *GAP* são similares àqueles obtidos com o promotor *AOX1* em culturas crescidas com metanol em frascos. Uma das vantagens do promotor *GAP* com relação ao promotor *AOX1* é que, por ser constitutivo, não é necessário mudar a cultura de um meio para outro para induzir expressão. No entanto, o uso do promotor *GAP* é apropriado somente para genes cujo produto não seja deletério para a célula. Além do mais, os níveis de expressão a partir do promotor *AOX1* são geralmente aumentados quando o metanol é adicionado à culturas com taxas de crescimento limitantes em fermentadores. O mesmo fenômeno não é observado com o promotor *GAP*.

Expressão heteróloga em *P. pastoris*

Sendo *P. pastoris* um organismo eucariótico, a produção de proteínas heterólogas neste sistema é um processo mais complexo do que em *E. coli*. Mesmo as proteínas que são produzidas em *P. pastoris* em concentrações acima de 1 g/L podem apresentar, em frascos, níveis desastrosos de produção inicial (menos de 1 mg/L). A geração de uma linhagem produtiva requer um grande esforço de investigação para se controlar os fatores que possam limitar a produção da proteína heteróloga, assim como desenvolver estratégias para otimização da produção. Para a detecção de baixos níveis de expressão, um fator chave para a obtenção de uma linhagem de *P. pastoris* produtiva é a disponibilidade de anticorpos específicos para a proteína heteróloga de interesse. É aconselhável que a seleção de clones prototróficos que expressam a proteína de interesse deva ser iniciada pela detecção imunológica do mesmo. Essa etapa permite selecionar clones expressando a proteína heteróloga em diversos níveis, o que poderia implicar a existência de clones com diversos números de cópias integradas do gene de interesse.

A maioria das proteínas secretadas por *P. pastoris* são glicosiladas, o que pode ou não afetar a atividade biológica da proteína recombinante. A glicosilação é

uma modificação pós-traducional que ocorre, primeiramente, no retículo endoplasmático e, posteriormente, no aparelho de Golgi. Observou-se que o tamanho da cadeia de carboidratos adicionados por *P. pastoris* é bem menor que aquele adicionado por *S. cerevisiae*. A estrutura destes oligossacarídeos é muito similar à adicionada em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações α -1,3, como *S. cerevisiae*, as proteínas produzidas em *P. pastoris* são menos imunogênicas. Todavia, se a glicosilação não é desejada, as proteínas de interesse devem ser produzidas intracelularmente. Algumas proteínas expressas em *P. pastoris* apresentaram um núcleo de glicosilação pequeno, como no caso da invertase de *S. cerevisiae*. Outras, como a proteína gp120 do HIV, apresentaram um padrão de glicosilação semelhante ao obtido em *S. cerevisiae*. Ainda não está claro porque a algumas proteínas são adicionadas cadeias externas longas de carboidratos e a outras apenas o núcleo central.

A levedura *P. pastoris* ganhou grande aceitação com organismo hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas de interesse farmacológico. Entre essas proteínas, destacam-se: a albumina sérica humana - que já está em testes clínicos para seu uso como produto de substituição de plasma -, e o antígeno de superfície da hepatite B - que foi aprovado para se fazer uma vacina contra esse vírus. Em nosso laboratório, temos empregado o sistema de expressão em *P. pastoris* para a expressão de várias proteínas de interesse biotecnológico. Algumas proteínas recombinantes serão utilizadas para fins farmacêuticos e outras para processos de conversão de biomassa. Dentre as proteínas já expressas por nosso grupo, destacam-se: 1) α -amilase de *Bacillus subtilis* (sozinha ou fusionada a uma glicoamilase de *Aspergillus awamori*); 2) um fragmento de anticorpo (scFv) anti-Z-DNA; 3) celobiohidrolase I.2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea*. No caso da proteína de fusão formada pelo gene da α -amilase de *Bacillus subtilis* e o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori*, a expressão foi realizada em duas linhagens de *P. pastoris*: uma protease negativa e a outra protease positiva. Os resultados preliminares mostraram que a melhor condição de expressão foi obtida quando a linhagem protease positiva foi usada e quando 3 cópias em sequência haviam sido integradas (Figuras 2 e 3). Aparentemente, o uso da linhagem protease negativa não é o ideal quando a expressão ocorre em altos níveis devido à necessidade de processamento pós-traducional da proteína de fusão. Por outro lado, no caso da expressão do fragmento de anticorpo scFv, o melhor resultado foi obtido com

uma linhagem protease negativa já que a proteína recombinante mostrou ser suscetível à ação das proteases produzidas por *P. pastoris*. Como no caso da proteína de fusão, a expressão da celobiohidrolase I.1 de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, o melhor resultado foi obtido com uma linhagem protease positiva. Experimentos preliminares demonstraram baixos níveis de expressão em frasco (cerca de 10 mg/L para a fusão e 1 mg/L para o fragmento scFv). No entanto, o rendimento poderá ser sensivelmente maior quando as condições de expressão em fermentador forem ajustadas.

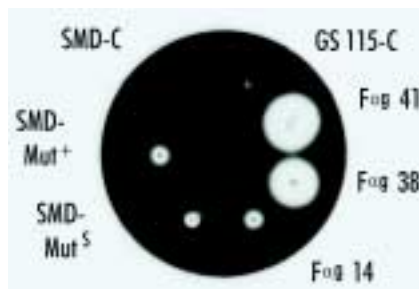


Figura 3: Expressão da fusão α amilase-glucoamilase em cepas de *P. pastoris* protease negativa (SMD) e protease positiva (GS115) em meio contendo amido. Após crescimento das células, a placa foi corada com vapor de iodo. GS115-C: cepa GS115 transformada com cassete de expressão sem a fusão; Føg41 e Føg38: cepa GS115 com 3 cópias da fusão; Føg14: cepa GS115 com 1 cópia da fusão; SMD-C: cepa SMD transformada com cassete de expressão sem a fusão; SMD-Mut⁺ e SMD-Mut^S: cepa SMD com 3 cópias da fusão

Perspectivas futuras

Com a finalidade de reduzir os custos das etapas "downstream" de produção de proteínas recombinantes a partir de *P. pastoris*, estamos construindo novos vetores que possibilitem a rápida purificação da proteína de interesse. Estamos também desenvolvendo novas estratégias que permitam a co-expressão de duas subunidades protéicas que formariam, então, uma proteína heterodimérica funcional. Essa estratégia seria útil para a expressão de alguns hormônios proteicos. A longo prazo, pretendemos isolar, a partir da biodiversidade do cerrado, novas espécies de levedura que possam ser empregadas como hospedeiras alternativas para expressão heteróloga. Esses novos sistemas poderão, eventualmente, reduzir os custos de produção com o pagamento de royalties ao exterior quando são utilizados sistemas de

expressão já patenteados.

Referências bibliográficas

- Barr, K. A., Hopkins, S. A. & Sreerishna, K. (1992). Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharmaceutical Engineering* 12: 48-51.
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, ^aY. & Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformants. *Molecular Cell Biology* 5: 3375-3385.
- Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholtz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P.^a, Davis, G. R., Smiley, B. L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G & Thill, G. P. (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 479-485.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S. & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11: 905-910.
- Cregg, J. M. (1999). Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Em "Gene Expression Systems", ed. Joseph M. Fernandez & James P. Hoeffler, Academic Press, ISBN 012253840-4.
- Higgins, D. R. & Cregg, J. M. (1998). *Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology, Human Press, Totawa, N. J.
- Moraes, L.M.P., Astolfi-Filho, S. & Oliver, S.G. (1995). Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express α -amilase and glucoamilase separately or as bifunctional fusion proteins. *Applied Microbiology Biotechnology* 43:1067-1076
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J.J. & Romanos, M. A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111-119.
- Siegel, R. S. & Brierley, R. A. (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnology Bioengineering* 34: 403-404.
- Sreerishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W. Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P. & Parker, K. (1989). High-level expression purification, and characterization, of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28: 4117-4125.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. L. & Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186: 37-44.