

## RESEÑA ANALÍTICA

# Utilización de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas

Elsa T. Pimienta y Carlos Vallín.

Laboratorio de Genética, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica, Avenida 21 y Calle 200, Reparto Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 28 de octubre de 2003. Aceptado: 22 de diciembre de 2003.

Palabras clave: *Streptomyces lividans*, secreción de proteínas, péptidos señal, proteínas heterólogas.  
Key words: *Streptomyces lividans*, protein secretion, signal peptides, heterologous proteins.

**RESUMEN.** La producción comercial de proteínas para uso terapéutico a partir de microorganismos recombinantes continúa siendo un tema de gran interés. Varios sistemas microbianos han sido desarrollados con esta finalidad, dentro de los cuales, *Escherichia coli* ha sido el hospedero que más aplicaciones ha recibido. Sin embargo, las proteínas expresadas por esta bacteria pueden solamente alcanzar el periplasma o en la mayoría de los casos, precipitar en forma desnaturada formando cuerpos de inclusión; lo cual puede comprometer seriamente los procesos de recobrado. Por estas razones, algunos géneros de bacterias Gram positivas están siendo investigados como hospederos para la producción de proteínas recombinantes, dada su habilidad de secretar proteínas al medio extracelular. Uno de los géneros seleccionados por su habilidad natural de secretar proteínas a elevadas cantidades, ha sido *Streptomyces*. Dentro de estos microorganismos, *Streptomyces lividans* ha sido el hospedero de elección para la producción secretora de proteínas heterólogas debido a que posee un bajo nivel de actividad proteolítica endógeno extracelular, una barrera reducida de restricción-modificación y sistemas de vectores establecidos. Por ello, es de considerable interés convertirlo en un hospedero bacteriano para la producción de proteínas homólogas y heterólogas. Se profundiza especialmente, en los elementos moleculares y los factores que influyen en la expresión y secreción de proteínas, así como en la optimización de las condiciones de su fermentación y dada su importancia, se concluye que hasta el presente, no es posible establecer reglas generales para la expresión y secreción de proteínas recombinantes en *Streptomyces*, sino que cada proteína necesita de un estudio básico cuidadoso antes de realizar las construcciones moleculares y los estudios de expresión secretora.

**ABSTRACT.** The commercial production of proteins in recombinant microorganisms for therapeutic use is of substantial interest. Several microbial systems have been developed so far, but when the microbial expression of recombinant proteins is discussed, *Escherichia coli* is usually assumed to be the host organism. However, in these bacteria, expressed proteins remain in the periplasm and often precipitate as inclusion bodies, which may seriously complicate downstream processing. Faced with this problem, several genders of Gram-positive bacteria are being tested as host for the production of heterologous proteins due to their ability to secrete proteins in the culture medium. Among them is *Streptomyces*, since several of their species are known to secrete proteins in high amounts. Due to the absence of an extensive restriction-modification system, limited protease activity and the availability of suitable vector systems, *Streptomyces lividans* is the host of choice for the secretory production of heterologous proteins. Therefore, it is of considerable interest to improve *Streptomyces lividans* as a bacterial host for obtaining homologous and several heterologous proteins with remarkable efficiency. In this article, it is reviewed the current knowledge on the molecular elements and factors that affect the expression and secretion of proteins, the optimization of fermentation conditions and the main studies made when *Streptomyces lividans* was used as host. It was concluded that at present there is not possible to establish a general rule for the expression and secretion of recombinant proteins in *Streptomyces* because each one need before a basic research about molecular elements and factors that affect exoexpression and secretion of proteins.

## INTRODUCCION

La obtención de proteínas eucarióticas con aplicaciones biofarmacéuticas a partir de sistemas de expresión ha sido ampliamente investigada en los últimos años. *Escherichia coli* ha sido el hospedero heterólogo preferentemente seleccionado debido fundamentalmente a su bien establecida fisiología, bioquímica, genética y a la amplia variedad de vectores de expresión disponibles. Sin embargo, las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que representa una barrera adicional a la secreción de proteínas, las cuales son generalmente retenidas en el espacio periplasmático. Las proteínas recombinantes sobreproducidas en *E. coli* pueden también acumularse en el citoplasma como agregados insolubles a los cuales se le denominan cuerpos de inclusión. Bajo estas condiciones de expresión, el recobrado de las proteínas requiere de ruptura celular y solubilización de los agregados con fuertes agentes desnaturantes, seguido de refoldo del polipéptido bajo condiciones apropiadas. Todos estos procedimientos requieren tiempo, inversiones y pueden ocasionar perjuicios al medio ambiente.<sup>1</sup> Teniendo en consideración las problemáticas anteriormente mencionadas, otros sistemas microbianos están bajo investigación; en especial, aquellos que son capaces de secretar proteínas al sobrenadante de cultivo. Un grupo de bacterias, que por su gran habilidad de producir proteínas nativas extracelulares a

elevadas concentraciones, ha recibido mucho interés en los últimos años, son las especies pertenecientes al género *Streptomyces*.<sup>2</sup> Los *Streptomyces* son bacterias Gram positivas, no patógenas, que exhiben un ciclo de vida morfológico y fisiológico complejo. Son encontrados abundantemente en los suelos donde degradan varios biopolímeros y gran cantidad de materiales orgánicos. En medio sólido crecen en forma micelial formando filamentos ramificados carentes de septos internos. Sus paredes celulares están compuestas de una capa simple de peptidoglicano de cuya organización se considera que facilita la liberación de proteínas al medio extracelular al carecer de membrana externa. Son considerados un reservorio de productos naturales debido a la amplia variedad de metabolitos que secretan, dentro de los cuales se incluyen: antimicrobianos, antifúngicos, inmunosupresores, enzimas hidrolíticas, inhibidores enzimáticos proteicos, entre otros.<sup>1</sup> Los buenos resultados obtenidos en la producción de proteínas homólogas y algunas heterólogas han estimulado que en los últimos años se hayan realizado considerables investigaciones dirigidas a explotar la habilidad natural de algunas especies de *Streptomyces* de secretar proteínas biológicamente activas con marcada eficiencia.<sup>3</sup> Paralelamente, en los últimos años, la tecnología de ADN recombinante en *Streptomyces* ha progresando rápidamente con la construcción de vectores mejorados incluyendo los bifuncionales, el desarrollo de varias herramientas genéticas como los transposones y sistemas de introducción de ADN, así como la secuenciación completa del genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) como cepa modelo.<sup>4,5</sup> Este trabajo se propuso analizar el conocimiento en estado del arte sobre el uso de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas, así como las perspectivas de su desarrollo como hospedero para la producción de proteínas industrialmente importantes.

#### ELEMENTOS MOLECULARES Y FACTORES INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS POR *STREPTOMYCES*

La producción secretora de proteínas recombinantes requiere de una expresión génica eficiente y del establecimiento de las condiciones

conocidas necesarias para su secreción. La expresión génica también depende de la disponibilidad de vectores y de los sistemas de introducción de ADN correspondientes. En la siguiente sección, se describen los factores y elementos moleculares más importantes que influyen en la producción secretora de proteínas en *Streptomyces*.

#### Cepas hospederas

A pesar de que *Streptomyces coelicolor* A3(2) es la especie mejor caracterizada desde el punto de vista genético dentro del género; otra especie muy cercana a ella, *Streptomyces lividans*, ha sido casi exclusivamente la especie de elección como hospedero para la producción de proteínas homólogas y heterólogas. Desafortunadamente, *S. coelicolor* A(3)2 contiene un poderoso sistema de restricción-modificación que actúa como una barrera de entrada y propagación fundamentalmente de vectores bifuncionales derivados de *E. coli*. Sin embargo, *S. lividans* y sus derivados carecen de este sistema y poseen una baja actividad proteolítica endógena extracelular. Además existe un amplio conocimiento sobre su tecnología de fermentación y los métodos de introducción de ADN por transformación y conjugación.<sup>2</sup>

#### Vectores

La mayoría de los plasmidios desarrollados para la sobreexpresión de genes en *S. lividans* son vectores bifuncionales *Streptomyces-E. coli*, basados en plasmidios derivados del replicón multicopias pIJ101 y exhiben un amplio espectro de hospederos en *Streptomyces*. El marcador de selección utilizado preferentemente para la selección recombinante en *S. lividans* es el gen de resistencia a tioestrep-tona de *S. azureus*. Los vectores bifuncionales simplifican considerablemente la construcción de derivados, ya que permiten que el trabajo de subclonajes sea realizado en *E. coli* y posteriormente, el clon seleccionado sea introducido en *Streptomyces*. Sin embargo, estos vectores han sido ocasionalmente descritos como inestables en *S. lividans*.<sup>4</sup>

También han sido desarrollados vectores integrativos con la finalidad de construir cepas que porten genes heterólogos integrados en su cromosoma, evitando así, la utilización de los marcadores de selección, generalmente antibióticos, para el mantenimiento de los plasmidios

en las producciones a gran escala. Actualmente, estos vectores pueden ser introducidos en *Streptomyces* por transformación o por conjugación.<sup>6</sup>

#### Transcripción

La transcripción de los genes ha sido correlacionada con la presencia de algunas formas de ARN polimerasas asociadas a diferentes factores *s* aislados en *Streptomyces*, los cuales reconocen promotores regulados específicos. Hasta el momento han sido descritos dos clases de promotores en *Streptomyces*: los promotores consensos *E. coli* y los no consensos. Los primeros son reconocidos por la ARN polimerasa de *Streptomyces* semejante al factor  $E\sigma^{70}$  de *E. coli*, de los cuales son ejemplos típicos *XP55-p* y *SEP-2*. En cambio, los segundos no poseen las regiones -10 y -35 típicas de los promotores de *E. coli* y por ende, no funcionan en *E. coli*. El sitio de inicio de la transcripción de genes en *Streptomyces* generalmente comienza 9-345 nucleótidos cuesta arriba de la región codificante.<sup>7</sup>

Para la expresión de genes de especies de *Streptomyces* que no sean *S. lividans*, los promotores nativos han sido generalmente conservados. Solamente en algunos casos, el original fue reemplazado por otros para su optimización. Por ejemplo, las cantidades extracelulares de  $\alpha$ -amilasa fueron incrementadas 16 veces cuando se reemplazó el nativo por el de la *aph* o el de *safR* y 2,5 veces cuando se utilizó el *lacZ* o el 114A.<sup>8</sup> Para los genes heterólogos a *Streptomyces*, en la mayoría de los casos, el nativo fue reemplazado por uno eficiente de *Streptomyces* como el de *aph*, *ermEup*, *saf*, *stiII*, el de  $\beta$ -galactosidasa y el *vsI* de *S. venezuelae*. Es importante destacar que promotores fuertes no garantizan una expresión eficiente de genes heterólogos. Además, diferentes promotores pueden tener un efecto diferente sobre el rendimiento del producto heterólogo.<sup>9,10</sup> Promotores inducibles también han sido descritos; entre ellos, el *tipA* inducible por tioestrep-tona y el *galP1* inducible por galactosa.<sup>11,12</sup> Hasta el momento, los inducibles han sido raramente utilizados en los sistemas de expresión de *Streptomyces*.

Los terminadores de la transcripción de genes de *Streptomyces* son generalmente semejantes a los encontrados en otras bacterias y contienen secuencias de nucleóti-

dos repetidas e invertidas que además, son largas e imperfectas semejantes a los terminadores rho independientes de *E. coli*. Sin embargo, carecen de largas secuencias de timidina, típicas de los terminadores de *E. coli*.<sup>3</sup>

Una eficiente terminación de la transcripción es uno de los factores que contribuye a una óptima expresión de las proteínas. En algunos casos, la utilización de terminadores de la transcripción ha contribuido notablemente a la estabilidad del ARNm y por ende, en la eficiencia de su traducción a proteína. Pulido y Jiménez reportaron que la adición de un terminador de la transcripción cuesta abajo del gen del interferón  $\alpha 2b$  humano incrementa la estabilidad del transcripto y provoca un aumento de cuatro veces en la producción de esta proteína en *S. lividans*.<sup>13</sup> Sin embargo, Schmitt-John y Engels no observaron ningún efecto sobre la producción de tendamistat al adicionar el mismo terminador de la transcripción cuesta abajo del gen;<sup>14</sup> mientras que Taguchi y col. observaron un incremento de 3,5 veces en la producción del inhibidor de subtilisina de *S. albobriseolus* (SSI) cuando seleccionaron el primero de los posibles terminadores de la transcripción presentes cuesta abajo del gen *ssi*.<sup>15</sup> La estabilidad del ARNm es un factor muy importante a considerar por su marcada influencia en la traducción de proteínas.

### Traducción

Muchas secuencias próximas a marcos abiertos de lecturas, a las cuales se les ha denominado sitio de unión al ribosoma o motivo Shine Delgarno, despliegan una significativa complementariedad al extremo 3' del ARN ribosomal 16S en *S. lividans* (3'-OH-UCUUCCUCCACUAG-5'). En *Streptomyces* esta secuencia consenso Shine Delgarno ha sido identificada como (a/g)GGAGG- con una localización de 5 a 12 nucleótidos cuesta arriba del codón de inicio de la traducción (ATG/GTG).<sup>16</sup> En contraste con otras bacterias, una fracción significativa de genes de *Streptomyces* son aparentemente traducidos a partir de transcriptos carente de secuencias líder, en los cuales, el inicio de la transcripción coincide con la primera base del codón de inicio de la traducción. Ejemplos de estos casos lo constituyen, el gen *aph* de la fosfotransferasa de aminoglucosidos de *S. fradiae* y el gen *ermE* de resistencia a eritro-

micina de *Saccharopolyspora erythraea*.<sup>17</sup>

También a nivel traduccional la expresión de una proteína puede ser aumentada. Algunos genes que codifican proteínas secretadas en *Streptomyces* contienen largas secuencias señales con dos codones de iniciación de la traducción, cada uno precedido de un sitio de unión al ribosoma. Utilizando estas largas secuencias señales, fue encontrado que la producción de la xilanasasa A fue incrementada de 1,5 a 2,5 veces en comparación con secuencias señales cortas. Esto fue explicado por el uso concomitante de dos sitios de unión al ribosoma consecutivos.<sup>18</sup>

También ha sido reportado que el uso de codones puede influenciar el rendimiento final de una proteína. El elevado contenido de GC de *Streptomyces* (53 a 74 %) conduce a un extremadamente elevado uso preferenciado de codones. Como consecuencia, ciertos codones en los genes pueden afectar la expresión debido a ausencia del ARNt apropiado. El codón TTA<sup>Leu</sup> es raramente utilizado en *Streptomyces* en las fases tempranas del crecimiento. La introducción del codón TTA<sup>Leu</sup> en el gen del inhibidor de subtilisina, provoca una considerable reducción de la producción de SSI en *S. lividans* hasta la fase estacionaria de crecimiento.<sup>19</sup> EL gen *bldA*, el cual codifica para un ARNt para el codón Leu, es también expresado en la fase tardía de crecimiento.<sup>20</sup>

La adaptación de algunos codones en el extremo amino terminal de TNF $\alpha$  de ratón indirectamente fusionado a la secuencia señal de  $\alpha$ -amilasa de *S. venezuelae* no incrementó la expresión de TNF $\alpha$  de ratón.<sup>21</sup> Esto indica que otros factores como la estabilidad del ARNm y el número de copias del plasmidio utilizado pueden afectar la expresión de genes heterólogos.

### Proceso de secreción general

Las proteínas que van a ser exportadas a través de una membrana citoplasmática por el proceso de secreción general (PSG) son sintetizadas generalmente como preproteína con una extensión amino terminal denominada péptido señal, el cual media la translocación de la proteína por el aparato secretor. La mayoría de las proteínas son exportadas a través del aparato Sec; el cual consiste, al menos, de la proteína SecA de membrana y del complejo proteico SecYEGDF en *E. coli*.

También desempeña un papel importante, la proteína SecB, que actúa como chaperona. SecB reconoce la proteína precursora, manteniéndola en una conformación competente para la translocación y promueve su interacción con SecA. Esta proteína reconoce la secuencia señal del precursor, su región madura no foldeada y SecB. Sin embargo, SecB ha sido encontrada solamente en bacterias Gram negativas. Como consecuencia, la función de SecB pudiera ser realizada por otras proteínas en bacterias Gram positivas. SecA tiene actividad ATPasa e interacciona con los fosfolípidos de la membrana y con la translocasa hexamérica, la cual consiste de SecY, E, G, D, F y YajC. El complejo media la translocación de precursores a través de la membrana utilizando ATP y la fuerza motriz transportadora de protones. El dominio SecYE de la translocasa es suficiente para que la translocasa se una a SecA y se active, pero una translocación eficiente requiere de SecG y de miembros del operón *secD* (SecD, SecF y YajC).<sup>22</sup> En *Streptomyces*, algunos genes han sido aislados e identificados, pero no se disponen de estudios mayores de profundización. Genes homólogos a *secB*, *secG* y *yajC* no han sido identificados hasta el momento.

Además de las proteínas Sec, hay chaperonas que pueden interactuar con los precursores en *E. coli*. Las chaperonas son proteínas que interactúan con conformaciones no nativas de otras proteínas para evitar la agregación de la nueva proteína sintetizada. Las interacciones representan un importante papel en mantener a los precursores en una forma competente para la secreción y posteriormente, en el foldeo de la proteína en su estructura nativa. Proteínas de las familias GroEl y DnaK, pertenecientes a las proteínas de choque y calor, actúan como chaperonas moleculares y desempeñan un protagonismo papel crucial en condiciones fisiológicas asistiendo en el foldeo de los nuevos polipéptidos sintetizados. La sobreexpresión y(o) co-expresión regulada de los operones *dnaK* y *groE* pueden guiar al aumento de la producción de una proteína de interés en *E. coli*.<sup>23</sup> Proteínas homólogas a las de choque y calor han sido descritas en *Streptomyces*, pero la influencia de su sobreexpresión no ha sido investigada hasta el momento.

A pesar de que los péptidos señales no muestran conservación de

secuencias aminoacídicas, ellos poseen una organización estructural tripartita común que comprende una región amino terminal, la cual contiene uno o más residuos aminoacídicos cargados positivamente (n-), una región central hidrofóbica (h-) con gran disposición a formar  $\alpha$ -hélices y una región carboxi terminal (c-) que porta el sitio de corte de la peptidasa señal. Este sitio de corte está precedido típicamente por la secuencia Ala-X-Ala en las posiciones -3 y -1, siendo X un residuo pequeño no cargado. El elevado contenido de GC de *Streptomyces* tiene efectos sobre la composición de la región n- del péptido señal. Debido a que los codones Arg son más ricos en GC que los de Lys, la Arg es más usada en los péptidos señales de *Streptomyces*, los cuales son de mayor tamaño comparado con los de otras bacterias. Modificaciones de la carga neta en la región n- de los péptidos señales puede tener una influencia dramática sobre el rendimiento de secreción en *Streptomyces*.<sup>24</sup>

Como ya se mencionó anteriormente, la unión de la preproteína a SecA, un componente clave en el proceso dependiente de Sec, es facilitada por el péptido señal. Como consecuencia, estos péptidos son factores relevantes que contribuyen a una secreción eficiente. El aislamiento y comparación de diferentes péptidos señales es, por ende, una importante vía para el aumento de los rendimientos, pero no es exclusivamente el único componente de valor. Un péptido señal eficiente para la excreción de ciertas proteínas no tiene que ser suficiente para la translocación de otras. Características particulares de la proteína madura parecen ser importantes como por ejemplo: la secuencia de aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína,<sup>25</sup> las propiedades físico-químicas como la hidrofobicidad y presencia de puentes disulfuro,<sup>26</sup> la longitud de ella, así como la susceptibilidad a las proteasas del hospedero.<sup>27</sup>

Después de la translocación de la proteína precursora, el péptido señal es normalmente removido por las peptidasas señales tipo I (SPasas). En contraste con *E. coli*, en el cual una sola SPasa tipo I esencial ha sido descubierta, algunas bacterias tienen más de una SPasa. Por ejemplo, en *S. lividans* y *S. coelicolor* A3(2) se han identificado cuatro peptidasas señales diferentes.<sup>28</sup> También en este paso, el péptido

señal puede ser un paso limitante del proceso de secreción.

La característica más sobresaliente del aparato Sec es que las proteínas son translocadas en una conformación extendida y están frecuentemente unidas a chaperonas citoplasmáticas para evitar el foldeo previo a la exportación. Recientemente, se ha descubierto que las bacterias, incluyendo *Streptomyces*, poseen un segundo proceso para exportar proteínas que difiere significativamente del aparato Sec. Este proceso independiente de Sec ha sido denominado Tat, ya que los precursores son translocados por péptidos señales que, aunque preservan la organización estructural tripartita de los péptidos señales Sec, presentan una secuencia motivo característica en la región n- que incluye dos consecutivos e invariables residuos de Arg. Este sistema utiliza como fuente de energía la procedente del gradiente de protones. Tres genes han sido identificados como componentes importantes de este sistema en *E. coli*. Ellos son *tatA*, *tatB* y *tatC*. El producto de estos genes forma la translocasa. Extraordinariamente, esta translocasa transporta únicamente proteínas foldeadas a través de la membrana citoplasmática.<sup>29</sup> El uso del sistema Tat es muy promisorio en su explotación para transportar proteínas heterólogas (sustratos del sistema Tat) a través de la membrana citoplasmática.

Los procesos y componentes anteriormente descritos desempeñan un importante papel en la célula. La sobreexpresión de proteínas del hospedero pueden eventualmente incrementar la concentración de la proteína objeto de estudio, como ha sido demostrado en *E. coli*.<sup>23</sup> Sin embargo, a pesar de que en los últimos años muchos componentes han sido identificados para diferentes especies de *Streptomyces*, no se han realizado estudios para manipular toda esta información con el objetivo de mejorar su secreción de proteínas. Es muy probable que sea necesaria una cepa hospedero mejorada para cada proteína recombinante; ya que por ejemplo, las chaperonas moleculares tienen diferentes capacidades de unión a cada proteína.

#### Susceptibilidad proteolítica

Una vez secretada, la proteína puede plegarse correctamente y así obtener, su actividad biológica. Sin embargo, la actividad proteolítica

del hospedero puede afectar dramáticamente los rendimientos de una proteína específica. Tanto las proteínas homólogas como heterólogas pueden ser alteradas proteolíticamente por *Streptomyces*, como es el caso del interferón  $\alpha 2b$  humano.<sup>30</sup> Varias proteasas extracelulares han sido clonadas y caracterizadas en *S. lividans* con la finalidad de contribuir al conocimiento y mejoramiento de la producción de proteínas en este hospedero. Por medio de deleciones o mutaciones de uno o más nucleótidos en los genes que codifican para estas proteasas han sido construidas varias cepas mejoradas de *S. lividans*; entre ellas, MS7 (tap<sup>-</sup>), MS9 (otra cepa tap<sup>-</sup>), MS11 (pepP<sup>-</sup>, pepP<sup>2</sup>, slpA<sup>-</sup>, slpC<sup>-</sup>, tap<sup>-</sup>, ssp) y M12 (Tap<sup>-</sup>, Ssp<sup>-</sup>). La cepa que muestra la actividad proteolítica extracelular más baja es M12. Aunque también se utilizan otras cepas, como por ejemplo la cepa MS7 para la obtención de GM-CSF.<sup>31</sup> También se ha descrito en *S. lividans*, dos proteasas asociadas al micelio, denominadas SlpD y SlpE, las cuales se consideran importantes para el crecimiento y la viabilidad. Por lo cual no se han podido construir cepas de *S. lividans* con estos genes delecionados.

#### OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION

Las condiciones de cultivos como la composición del medio de cultivo, el oxígeno disponible, la temperatura y la agitación tienen un significativo impacto sobre la producción de proteínas. Por ello, es muy importante la optimización de estos factores. Al mismo tiempo, aspectos técnico-económicos deben ser incluidos en el análisis, si el proceso va a ser escalado. Dada la experiencia acumulada en más de 50 años de producción de enzimas y antibióticos en *Streptomyces*, es muy probable que la industria farmacéutica tenga acumulada gran cantidad de información. Desafortunadamente, muy poca de ella está disponible en la literatura primaria. A continuación, se refieren algunos estudios importantes descritos.

Uno de los estudios más interesantes fue el realizado por Erpicum y col., en el cual, se estudió la producción de  $\beta$ -lactamasas por *Streptomyces* y se obtuvieron los mejores resultados en un medio que contenía glucosa y cloruro de amonio a pH 7,4 estabilizado. Un incremento significativo fue obtenido con la adición de hasta un 38 % de sacarosa al me-

dio de cultivo. A pesar de que esta es pobremente metabolizada, parece tener un efecto estabilizador sobre las enzimas y posiblemente, sobre las células.<sup>32</sup>

Grandes cantidades de nutrientes (hasta 100 g/L de glucosa y 67 g/L de triptona) fueron necesarios para obtener una buena producción de hidrolasa de paratión en *S. lividans*. Sin embargo, estos nutrientes tuvieron que ser adicionados gradualmente con la finalidad de evitar la acumulación de bioproductos ácidos. Este problema fue notablemente mejorado al suministrar gas enriquecido en oxígeno.<sup>33</sup> Lee y col. también observaron la mejor producción de una  $\beta$ -lactamasa recombinante al utilizar bajas concentraciones de glucosa y grandes de oxígeno disuelto.<sup>34</sup>

El efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de proteínas ha sido ampliamente estudiado en *Streptomyces*, siendo la glucosa la fuente de carbono seleccionada preferentemente. Uno de los trabajos más representativos aplicados a la secreción de proteínas, lo constituye el estudio realizado por Pérez Mellado, en el cual, se estudia el efecto de la glucosa sobre la secreción de la agarasa de *S. coelicolor*. En este estudio se observó un efecto represor sobre la producción de esta proteína a elevadas concentraciones de glucosa (5 %). Y fue más marcada la represión a nivel de la secreción que a nivel transcripcional. También se observó una disminución considerable de la secreción de proteasas.<sup>35</sup> Posteriormente, las secuencias regulatorias y de secreción de esta agarasa extracelular fueron utilizadas para dirigir la secreción heteróloga de una  $\beta$ -lactamasa de *E. coli* en *S. lividans*. La regulación transcripcional de este gen quimérico y los patrones de secreción del producto génico coinciden con los observados en el caso de la agarasa. El efecto negativo de elevadas concentraciones de glucosa sobre la secreción de esta  $\beta$ -lactamasa fue revertido cuando la bacteria recombinante fue crecida bajo concentraciones limitantes de fosfato.<sup>36</sup>

El efecto de las proteasas del hospedero sobre los rendimientos de las proteínas recombinantes ha sido ampliamente descrito. Se han utilizado diferentes nutrientes en los medios de cultivos con la finalidad de afectar la expresión-secreción de las proteasas. Aretz y col. adicionaron  $Zn^{2+}$  al medio de cultivo para intentar inhibir una proteasa

que degradaba una proteína de fusión formada por el tendamistat y la proinsulina.<sup>37</sup> Haas-Lauterbach y col.<sup>26</sup> observaron la mejor producción de tendamistat recombinante cuando *S. lividans* fue crecido a 19 °C con 3 % de peptona de caseína. Fornwald y col. reportaron que la proteólisis limitó la acumulación de derivados solubles del receptor CD4 de células T humano. La adición de casaminoácidos al medio de cultivo aumentó significativamente el tiempo de vida media de estas proteínas.<sup>38</sup> Sin embargo, esta estrategia no ha dado los mismos resultados en otros casos.

#### APLICACIONES Y RENDIMIENTOS DE PRODUCCION

Muchos genes homólogos han sido exitosamente expresados y las proteínas codificadas por ellos rápidamente secretadas por *S. lividans*. En muchos casos, los niveles de producción se incrementaron al compararlos con los rendimientos de producción de la cepa original. Se utilizaron las mismas señales reguladoras de la cepa original por lo que se atribuyó el incremento en la producción al efecto del número de copias del gen clonado en plasmidios de elevado número de copias. La proteína recombinante fue, en la mayoría de los casos, la predominante en el medio extracelular de *S. lividans*, obteniéndose hasta varios gramos por litro de filtrado de cultivo (ejemplos agarasas, celulasas y hemicelulasas). Varios ejemplos de proteínas eucariotas heterólogas producidas por *Streptomyces* se han descrito, algunos de los cuales, se han comercializado.<sup>1</sup>

Las proteínas secretadas por *Streptomyces* son generalmente solubles y se encuentran correctamente foldeadas; por ende, no hay necesidad de resolubilización y replegamiento para obtenerlas activas biológicamente. Por otra parte, las proteínas son recobradas del sobrenadante de cultivo por procedimientos establecidos como la ultracentrifugación y(o) por ejemplo, adsorción sobre cromatografía de intercambio iónico, entre otros, dependiendo de las propiedades físico-químicas, niveles de expresión obtenidos, etc., de la proteína en cuestión.<sup>39</sup>

Varios ejemplos de proteínas procariontas secretadas por *Streptomyces* han sido descritos.<sup>1</sup> Secuencias reguladoras de proteínas homólogas bien secretadas por *Streptomyces* han sido utilizadas en la producción

de proteínas eucariotas. Sin embargo, los rendimientos no han sido elevados en la mayoría de los casos. Uno de estos ejemplos ha sido el estudio de la secreción de interferón a 2b humano (IFN $\alpha$ -2bh) bajo el control del promotor *ermEp\** del gen de resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea* y las señales reguladoras y de secreción de la lipasa A de *S. exfoliatus* M 11 en *S. lividans*. El péptido señal de la lipasa A ha sido uno de los más largos utilizados en *Streptomyces* (48 aminoácidos). Se realizaron dos tipos de fusiones génicas entre el gen del *ifn $\alpha$ -2bh* y la secuencia señal de la lipasa A: una fusión directa y otra fusión espaciada por seis codones. El IFN $\alpha$ -2bh secretado por la cepas recombinantes de *S. lividans* fue detectado después de 20 h de crecimiento, alcanzando sus concentraciones máximas a las 48 h y después disminuyó drásticamente. Las concentraciones de IFN $\alpha$ -2bh detectadas en el sobrenadante de cultivo fueron bajas. La máxima detectada por ELISA fue 100 ng/mL para la cepa de *S. lividans* transformada con el plasmidio que posee la fusión génica espaciada por seis codones. El título antiviral de este IFN $\alpha$ -2bh secretado fue  $(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^4$  U/mL de sobrenadante de cultivo. Sin embargo, el producto recombinante secretado fue parcialmente modificado cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria por la acción de un factor no identificado asociado al micelio. Evidencias experimentales sugieren que dicho factor está relacionado con la actividad proteolítica del micelio.<sup>30</sup> Diferentes estrategias se están realizando con el objetivo de incrementar los rendimientos de esta proteína, entre ellas, la fusión del gen del *ifn $\alpha$ -2bh* a diferentes señales reguladoras y de secreción pertenecientes a proteínas bien secretadas por *Streptomyces*.

Los mejores resultados con más de 300 mg de proteína/L de cultivo, fueron obtenidos para el receptor CD4 soluble bajo el control de las secuencias reguladoras y de secreción del gen del inhibidor de tripsina de *Streptomyces longisporus*<sup>38</sup> y también para el TNF $\alpha$  bajo el control de las secuencias reguladoras del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae* CBS762.70. En este último estudio, se encontró que al mutagenizar sitio específicamente la secuencia nucleotídica codificante para la región amino terminal del péptido señal, de forma tal que

disminuyera la carga neta positiva de esta región de +3 (proteína salvaje) a +2 se obtuvieron incrementos de 2 a 10 veces en la producción secretora de esta proteína,<sup>9</sup> la cual, ha sido obtenida también a escala piloto de producción y todos los factores desde el punto de vista de fermentación y purificación han sido establecidos exitosamente.<sup>40</sup> La mutagénesis de las secuencias señales ha sido una estrategia utilizada para aumentar la eficiencia de la secreción de las proteínas sintetizadas. Al utilizar la secuencia señal del inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae*, otras proteínas, incluyendo algunas interleucinas humanas y receptores solubles del TNF $\alpha$ m, fueron obtenidas a bajas concentraciones. Las razones de este fenómeno no son obvias, pero las características físico-químicas de las proteínas a ser secretadas son factores importantes. La hidrofobicidad de algunas de ellas, como la interleucina 2, ha sido crucial en la obtención de bajas concentraciones de secreción en *S. lividans*.<sup>2</sup> La presencia de puentes disulfuro en la proteína madura ha tenido impacto también, a nivel de la secreción. Haas-Lauterbach y col. observaron que los análogos del tendamistat con diferentes combinaciones de puentes disulfuro fueron secretados a diferentes concentraciones. El tendamistat tiene cuatro cisteínas las cuales forman dos puentes disulfuro. La sustitución de una de estas cisteínas guía a una disminución en su producción, mientras que los dobles mutantes

mostraron un incremento en la producción entre 2 a 10 veces respecto al producto nativo. Los grupos SH-libres en los mutantes simples pudieron interferir en el correcto plegado de la proteína o provocar la formación de dímeros que interfieren en el proceso de translocación.<sup>26</sup> Respecto a la formación de los puentes disulfuro, esta no ocurre siempre correctamente. En el caso de la secreción de la insulina por *S. lividans*, fue necesario refoldar a los diferentes derivados en disolución, los cuales fueron obtenidos después de un corte proteolítico para separarlos de la proteína de fusión formada por el tendamistat y la proinsulina. Después del refoldo, los derivados mostraron una gran actividad biológica.<sup>41</sup> En atención a los casos anteriormente mencionados, se ha planteado la existencia de factores desconocidos involucrados en la formación de los puentes disulfuro en *Streptomyces*. Se conocen ejemplos de proteínas eucariotas secretadas por cepas recombinantes de *S. lividans* (Tabla 1).

## CONCLUSIONES

Hasta el presente, no es posible establecer reglas generales para la expresión y secreción de proteínas recombinantes en *Streptomyces*, del cual existe poco conocimiento sobre su sistema secretor. En general, las proteínas de origen procarionta son más eficientemente producidas que las eucariotas en esta bacteria. Tanto para las proteínas homólogas

como heterólogas, el rendimiento puede ser incrementado por la combinación de un promotor fuerte con eficientes señales de traducción y de translocación. Esto tiene que ser estudiado para cada proteína en particular. El genoma de *Streptomyces* posee un gran contenido de GC con un uso preferenciado de codones. Como resultado, la presencia de algunos codones de poco uso en *Streptomyces* puede influir en la eficiencia de traducción. Sin embargo, este problema solo ha ocurrido en pocos casos. Por otra parte, la adaptación de codones raros en los genes heterólogos al uso de codones de la cepa recombinante no siempre ha dado buenos resultados. Probablemente, el factor más importante en la producción de proteínas recombinantes lo constituyen las propiedades físico-químicas de la proteína de interés, por ejemplo, la hidrofobicidad y los puentes disulfuro, los cuales pueden causar problemas en el correcto plegamiento y por ende, en la actividad biológica de la proteína. También la compatibilidad de la proteína a ser secretada con las específicas del proceso de secreción, como las chaperonas moleculares, puede ser clave. Para obtener un mejor acercamiento a este problema, las proteínas de los procesos de secreción y sus interacciones con las proteínas que van a ser secretadas deben ser caracterizadas en detalle. Cepas con una capacidad de secreción aumentada podrán entonces ser desarrolladas. Por ejemplo, la sobreproducción de componentes

**Tabla 1.** Ejemplos de proteínas de origen eucariota secretadas por cepas recombinantes de *S. lividans*.

Proteína	Fuente	Promotora	Secuencia señal <sup>a</sup>	Rendimiento <sup>b</sup>	Secreción	Ref.
TNF $\alpha$	humana	<i>ermEp1a</i>	melC1	20	NI	17
IFN $\alpha$ 1	humana	<i>Sak</i>	<i>sak</i>	1 a 2 · 10 <sup>5</sup> U/mL	> 90 %	42
IFN $\alpha$ 2b	humana	<i>ermEp*</i>	<i>lipA</i>	(1,4 ± 0,4) · 10 <sup>4</sup> U/mL	> 90 %	30
IL-1 $\beta$	humana	$\beta$ -gal	$\beta$ -gal	3,8 · 10 <sup>6</sup> U/mL	98 %	43
Proinsulina	<i>Macaca fascicularis</i>	AI	AI	20 a 100	100 %	41
Hirudina	<i>Hirudo medicinalis</i>	AI	AI	2,2 a 0,5	100 %	44
sCD4(D1D2)	humana	<i>sti-II</i>	<i>sti-II</i>	> 300	NI	38
TNF $\alpha$	ratón	<i>Vsi</i>	<i>vsj</i>	> 300	60 %	9
NF $\alpha$	ratón	<i>Aml</i>	<i>aml</i>	1 a 10	100 %	45
Apidaecin	<i>Apis mellifera</i>	<i>Ssi</i>	<i>ssi</i>	200	NI	46
R-EPO	humana	<i>Aph</i>	<i>priBz</i>	15	NI	47

<sup>a</sup> Origen del promotor y de la secuencia señal. AI Inhibidor de  $\alpha$ -amilasa de *S. tendae*. *aml*  $\alpha$ -Amilasa de *S. venezuelae*. *aph* Fosfotransferasa de aminoglucósidos de *S. fradiae*. *ermEp1a* y *ermEp\** Gen resistencia a eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*.  $\beta$ -gal  $\beta$ -Galactosidasa de *S. lividans*. *melC1* Melanina de *S. antibioticus*. *priBz* Proteasa B de *S. grises*. *lipA* Lipasa A de *S. exfoliatus* M11. *sak* Estafiloquinasa de *Staphylococcus aureus*. *ssi* Inhibidor de subtilisina de *S. albogriseolus*. *sti-II* Inhibidor de subtilisina/tripsina de *S. longisporus*. *vsj* Inhibidor de subtilisina de *S. venezuelae*. <sup>b</sup> Rendimientos en miligramos por litro si no es indicado. NI No indicado.

específicos del PSG puede tener un efecto positivo sobre los rendimientos de las proteínas recombinantes. Actualmente se dispone de la secuencia completa del genoma del actinomiceto modelo *S. coelicolor* A3(2), del cual, se conoce que contiene el número más grande de genes descrito para una bacteria hasta el momento, los cuales poseen una proporción sin precedentes de funciones reguladoras. Esta herramienta ofrece muchas ventajas debido a la alta homología que existe entre los genes de *S. coelicolor* y los genes secuenciados de *S. lividans* hasta el momento y contribuye significativamente a alcanzar un mejor acercamiento al conocimiento del sistema secretor de *Streptomyces*.

## BIBLIOGRAFIA

- Gilbert M., Morosoli R., Shareck F. and Kluepfel D. Production and secretion of proteins by Streptomyces. **Crit. Reviews Biotechnol.**, **15**, 13, 1995.
- Van Mellaert L. and Anné J. Protein secretion in Gram-positive bacteria with high GC-content. **Recent Res. Devel. Microbiol.**, **3**, 425, 1999.
- Binnie C., Cossar J.D. and Stewart D.I.H. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. **Trends Biotechnol.**, **15**, 315, 1997.
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 2000.
- Bentley *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *S. coelicolor* A3(2). **Nature**, **417**, 141, 2002.
- Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Nagaraja Rao R. and Schonher B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. **Gene**, **116**, 43, 1992.
- Butner M.J., Chater K.F. and Bibb M.J. Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.**, **172**, 3367, 1990.
- Vigal T., Gil J.A., Daza A., García-González M.D., Villadas P., and Martín J.F. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of  $\alpha$ -amylase by *Streptomyces lividans*. **Mol. Gen. Genet.**, **231**, 88, 1991.
- Lammertyn E. *et al.* Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. **Appl. Envir. Microbiol.**, **63**, 1808, 1997.
- Brawner M.E. Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. **Curr. Op. Biotechnol.**, **5**, 475, 1994.
- Takano E., White J., Thompson C.J. and Bibb M.J. Construction of tics-trepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. **Gene**, **166**, 133, 1995.
- Fornwald J.A., Schmidt F.J., Adams C.W., Rosenberg M. and Brawner M.E. Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *S. lividans* galactose operon. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **84**, 2130, 1987.
- Pulido D. and Jiménez A. Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator. **Nucl. Acids Res.**, **15**, 4227, 1987.
- Schmitt-John T. and Engels J.W. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **36**, 493, 1992.
- Taguchi S., Yoshida Y., Kumagai I., Miura K. and Momose H. Effect of downstream message secondary structure on the secretory expression of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor. **FEMS Microbiol. Lett.**, **107**, 185, 1993.
- Strohl W.R. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. **Nucl. Acids Res.**, **20**, 961, 1992.
- Chang S.Y. and Chang S. Secretion of heterologous proteins in *Streptomyces lividans*. In: Okami Y, Beppu T, Ogawara H (ed.) Proceedings of the Seventh International Symposium on Biology of Actinomycetes 88. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 103, 1988.
- Page N., Kluepfel D., Schareck F. and Morosoli R. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: Dependence on number of ribosome-binding sites. **Nature Biotechnol.**, **14**, 756, 1996.
- Ueda Y., Taguchi S., Nishiyama K.I., Kumagai I. and Miura K.I. Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*. **Biochim. Biophys. Acta**, **1172**, 262, 1993.
- Leskiw B.K., Mah R., Lawlor E.J. and Chater K.F. Accumulation of *bldA*-specific tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.**, **175**, 1995, 1993.
- Lammertyn E., Van Mellaert L., Bijnens A.P., Joris B. and Anné J. Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *S. lividans* can lead to decreased mRNA stability and protein yield. **Mol. Gen. Genet.**, **250**, 223, 1996.
- Duong F. and Wickner W. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein. **EMBO J.**, **16**, 2756, 1997.
- Thomas J.G., Ayling A. and Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, **66**, 197, 1997.
- Lammertyn E. and Anné J. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. **FEMS Microbiol. Lett.**, **160**, 1, 1998.
- Brawner M., Poste G., Rosenberg M. and Westpheling J. *Streptomyces*: a host for heterologous gene expression. **Curr. Op. Biotechnol.**, **2**, 674, 1991.
- Hass-Lauterbach S., Scharf M., Sprunkel B., Neeb M., and Koller K.P. High fermentation and purification of tendamistat disulphide analogues secreted by *Streptomyces lividans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **38**, 719, 1993.
- Binnie C. *et al.* Isolation and characterization of two genes encoding proteases associated with the mycelium of *Streptomyces lividans* 66. **J. Bacteriol.**, **177**, 6033, 1995.
- Parro V., Schacht S., Anné J. and P. Mellado R. Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK 21. **Microbiol.**, **145**, 2255, 1999.
- Schaerlaekens K., Schierová M., Lammertyn E., Geukens N., Anné J. and Van Mellaert L. Twin-Arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. **J. Bacteriol.**, **183**, 6727, 2001.
- Pimienta E., Fando R., Sánchez J.C. and Vallín C. Secretion of human interferon alpha 2b by *Streptomyces lividans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **58**, 189, 2002.
- Garvin R.T., Malek L.T. Patent US5641663, 1997.
- Ericum T. *et al.* Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains: influence of culture conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, **35**, 719, 1990.
- De la Cruz N., Payne G.F., Smith J.M. and Coppella S.J. Bioprocess development to improve foreign protein production from recombinant *Streptomyces*. **Biotechnol. Prog.**, **8**, 307, 1992.
- Lee J.H. and Lee K.J. Effect of growth rate and cultivation environments on cloned gene stability and the cloned gene product formation in *Streptomyces lividans*. **J. Biotechnol.**, **33**, 195, 1994.
- Parro V. and P. Mellado R. Effect of glucose on agarose overproduction by *Streptomyces*. **Gene**, **145**, 49, 1994.
- Isiegas C., Parro V. and P. Mellado R. *Streptomyces lividans* as a host for the production and secretion of *Escherichia coli* TEM  $\beta$ -lactamase. **Let. Appl. Microbiol.**, **28**, 321, 1999.
- Aretz W., Koller K.P. and Riess G. Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK 24. **FEMS Microbiol. Lett.**, **65**, 31, 1989.
- Fornwald J.A. *et al.* Soluble forms of the human T cell receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans*. **Biotechnol.**, **11**, 1031, 1993.
- Engels J.W. and Koller K.P. Gene expression and secretion of eukaryotic proteins in *Streptomyces*. En: Transgenesis (Murray, J. A. H., Ed.) 32-53. John Wiley and Sons, New York, 1992.

40. Charalambos P. *et al.* Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Biotechnol. Bioengin.**, **72**, 612, 2001.
41. Koller K.P., Riess G., Klaus S., Uhlman E. and Wallmeier, H. Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of tendamistat and proinsulin. **Biotechnol.**, **7**, 1055, 1989.
42. Noack D., Geuther R., Tonew M., Breitling R. and Behnke D. Expression and secretion of interferon- $\alpha$ 1 by *S. lividans*: use of staphylokinase signals and amplification of a *neo* gene. **Gene**, **68**, 53, 1988.
43. Lichenstein H. *et al.* Secretion of interleukin-1 $\beta$  and *E. coli* galactokinase by *S. lividans*. **J. Bacteriol.**, **170**, 3924, 1988.
44. Bender E., Vogel R., Koller K.P. and Engels J. Synthesis and secretion of hirudin by *Streptomyces lividans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **34**, 203, 1990.
45. Van Mellaert L. *et al.* Efficient secretion of biologically active mouse tumor necrosis factor  $\alpha$  by *Streptomyces lividans*. **Gene**, **150**, 153, 1994.
46. Taguchi S., Maeno M. and Momose H. Production of antibacterial peptide "Apidaecin" using de secretory expression system of *Streptomyces*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **57**, 1206, 1993.
47. Binnie C. *et al.* Characterization of soluble human erythropoietin receptor made in *S. lividans*. **Protein Expr. Purif.**, **11**, 271, 1997.

---

## CONVOCATORIA

# 5. CONGRESO INTERNACIONAL DE EDUCACION SUPERIOR "UNIVERSIDAD 2006"

13 al 17 de febrero del 2006 en el Palacio de Convenciones de La Habana.

"La Universalización de la Universidad por un mundo mejor"

### TEMAS CENTRALES

- 📖 Experiencias en la universalización de la universidad.
- 📖 Desarrollo y perspectivas de la educación superior por un mundo mejor.
- 📖 El perfeccionamiento de la pedagogía y la didáctica de la educación superior.
- 📖 La educación de posgrado y el desarrollo de la sociedad. Su pertinencia e impacto.
- 📖 Aportes concretos de las universidades para el desarrollo sostenible.
- 📖 Las tendencias y desafíos actuales de la internacionalización de la educación superior.
- 📖 Políticas y estrategias sobre la evaluación de la calidad y acreditación en la educación superior.
- 📖 Tecnologías, modelos, realidades y perspectivas de la educación a distancia.
- 📖 Retos y perspectivas de la investigación científica en las universidades.
- 📖 Las tecnologías de la información y la comunicación en la transformación de los procesos universitarios.
- 📖 La extensión universitaria como una opción viable por un mundo mejor.
- 📖 La práctica y la investigación en la formación universitaria en Turismo.
- 📖 Papel de las organizaciones sindicales y estudiantiles en las universidades por la construcción de un mundo mejor.

### TALLERES Y SIMPOSIOS

- 📖 Simposio de Universalización de la Universidad. 📖 VIII Taller Internacional "La Educación Superior y sus Perspectivas". 📖 VIII Junta Consultiva sobre el Postgrado en Iberoamérica.
- 📖 VII Taller Internacional de Educación a Distancia. 📖 VIII Taller de Extensión Universitaria. 📖 V Taller de Pedagogía de la Educación Superior. 📖 V Taller "Universidad, Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible". 📖 V Simposio "Universidad, Ciencia y Tecnología".
- 📖 III Taller Internacional de Evaluación de la Calidad y Acreditación en la Educación Superior. 📖 III Taller de Internacionalización de la Educación Superior. 📖 II Conferencia "Retos de la Educación Superior frente al Desarrollo Turístico".

**Secretaría Ejecutiva UNIVERSIDAD 2006, Ministerio de Educación Superior**

Calle 23 No. 565, esquina a calle F, Vedado, La Habana, Cuba. Telefax: (537) 8311613 y 8351083.

E-mail: [univ2006@reduniv.edu.cu](mailto:univ2006@reduniv.edu.cu) Sitio web: <http://www.universidad2006.cu>