

RESEÑA

EVALUACIÓN DE *STREPTOMYCES LIVIDANS* COMO HOSPEDERO PARA LA EXPRESIÓN DE INTERFERÓN alfa 2b Y ESTREPTOQUINASA

Lic. Elsa T. Pimienta Rodríguez.

Grupo de Desarrollo e Investigación, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba.

4 de Junio de 2009.

TRABAJO PRESENTADO EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD.

Los sistemas de expresión heteróloga se utilizan frecuentemente para la producción de proteínas de importancia biofarmacéutica debido a que pueden alcanzar mayores niveles de producción que la fuente original. Las bacterias son, en muchos casos, los hospederos más utilizados debido a sus características de crecimiento y los bajos costos relativos asociados. *Escherichia coli* continúa siendo el hospedero bacteriano más utilizado debido fundamentalmente, a su genética bien caracterizada. En general, en este microorganismo, las proteínas recombinantes sobre-expresadas se acumulan frecuentemente en cuerpos de inclusión en el citoplasma o en el espacio periplasmático, lo cual requiere de procesos de extracción de las proteínas con agentes fuertes y de renaturalización para el repliegamiento adecuado de las proteínas, los cuales pueden afectar su actividad biológica.

Por tales razones, algunos géneros de bacterias gram positivas están siendo evaluados como hospederos para la producción de proteínas heterólogas debido a que estas bacterias secretan directamente las proteínas al medio extracelular, lo cual favorece su posterior recobrado. Particularmente, *Streptomyces lividans* secreta naturalmente grandes cantidades de enzimas hidrolíticas, no posee un extenso sistema de restricción-modificación al ADN foráneo y no es patógeno a los humanos.

Cuando se ha utilizado a *S. lividans* para la producción de proteínas recombinantes, la estrategia ha sido fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada a través de la vía de secreción Sec. Uno de los ejemplos más sobresalientes ha sido la obtención del factor α de necrosis tumoral murino (mTNF α) a concentraciones de 300 mg · L⁻¹ de sobrenadante de cultivo (SN) cuando se utilizaron las señales reguladoras y de secreción del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (Vsi).

Recientemente, se informó sobre la funcionalidad del proceso de translocación "twin-arginine" (Tat) en *S. lividans*; que, a diferencia del proceso Sec, secreta proteínas de variadas dimensiones que han adquirido algún grado de estructura terciaria en el citoplasma. Este proceso de secreción fue recientemente evaluado para la expresión del factor α de necrosis tumoral humano (hTNF α) y la interleucina 10 humana (IL-10) en *S. lividans* TK24. Ambas proteínas fueron fusionadas, por separado, al péptido señal de la xilanasasa C de *S. lividans* (XlnC-sp) o al de la tirosinasa de *Streptomyces antibioticus* (MelC1-sp) y se secretaron a bajas concentraciones a través de la vía Tat en *S. lividans*.

Para estudiar la secreción de proteínas heterólogas a través de las vías Sec y Tat en *S. lividans*, se analizaron las propiedades terapéuticas del interferón α 2b humano (IFN α 2b) y la estreptoquinasa de *Streptococcus equisimilis* (SKC). El IFN α 2b ha sido utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de hepatitis B y C, papilomatosis respiratoria, esclerosis múltiple, conjuntivitis hemorrágica, esquizofrenia, entre otras. La SKC fue la primera droga introducida como terapia para el infarto agudo del miocardio hace más de 40 años y es un agente fibrinolítico de elección en países en vías de desarrollo. La obtención de ambas proteínas por vía recombinante ha sido extensamente investigada considerando las limitaciones de obtención a partir de su fuente natural. El IFN α 2b es una proteína secretada naturalmente por los leucocitos humanos, mientras que la SKC es secretada por *Streptococcus equisimilis* al medio de cultivo a bajos niveles. *S. equisimilis* secreta varias toxinas al medio extracelular que son potencialmente inmunogénicas en humanos.

En Cuba, se reportó la expresión del IFN α 2b en *E. coli* por primera vez por Silva y cols. en 1988. Posteriormente, se informó la expresión a elevadas concentraciones de la estreptoquinasa mutante SKC-2 por Estrada y cols. Desde hace varios años estas dos proteínas se producen en Cuba como productos recombinantes obtenidos a partir de *E. coli*. Sin embargo, ambas moléculas se acumulan inactivas en cuerpos de inclusión en el citoplasma, lo cual tiene la desventaja de requerir procesos de extracción y renaturalización para la solubilización y el repliegamiento adecuado de las proteínas. Durante el proceso de renaturalización ocurren pérdidas considerables de las proteínas y se recuperan moléculas acetiladas, con aminoácidos oxidados, con una metionina en el extremo amino, formando agregados moleculares y en el caso del IFN α 2b con cisteínas parcial o completamente reducidas o con puentes disulfuro malformados.

En este estudio, se evalúa la utilidad de *S. lividans* TK24 para secretar interferón α 2b humano (IFN α 2b) y estreptoquinasa de *Streptococcus equisimilis* ATCC9542 (SKC-2) biológicamente activos al medio de cultivo. Para mediar la secreción de ambas proteínas se seleccionaron los péptidos señales del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (Vsi-sp) –dependiente de la vía Sec-, de la xilanasasa C de *Streptomyces lividans* –dependiente de la vía Tat- y el de la lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11 (LipA-sp), el cual no había sido utilizado con anterioridad. También se estudia la relevancia de la genética de las vías de secreción Sec y Tat de *S. lividans* TK24 en el proceso de producción y se centra la atención en los aspectos fisiológicos del evento productivo.

Se seleccionó al derivado *S. lividans* TK24 como hospedero, ya que posee relativamente baja actividad de proteasas extracelulares. Las enzimas y reactivos fueron utilizados de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La clonación de los genes *ifn α 2b* y *skc-2* en vectores replicativos bifuncionales *E. coli* - *Streptomyces* se realizó siguiendo técnicas estándares. Particularmente, el gen *skc-2* fue amplificado a partir del cromosoma de *S. equisimilis* ATCC9542 mediante una PCR utilizando oligonucleótidos apropiados para este fin. La introducción de los plasmidios obtenidos en la cepa salvaje, se realizó mediante el método de transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol. La detección inmunoquímica de las proteínas IFN α 2b y SKC-2 en los SN se realizó mediante las técnicas de *Western blotting* y ELISA.

Continúa en la p.218

EVALUACIÓN DE *STREPTOMYCES LIVIDANS* (Continuación de la p.214)

El péptido señal Vsi —dependiente de la vía Sec— fue eficiente en dirigir la translocación de la SKC-2 biológicamente activa al medio extracelular de *S. lividans* TK24. Hasta $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de la SKC-2 fue cuantificada en el medio de cultivo de *S. lividans* [pO-VsiSK] crecido en zaranda. Estas cantidades de SKC-2 secretada permitieron purificar la proteína mediante las técnicas cromatográficas de intercambio aniónico e interacciones hidrofóbicas. El análisis cuantitativo de las distintas etapas del proceso de purificación de la SKC-2 reveló que su actividad específica se incrementó de $2\ 125 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$, en la etapa cromatográfica de intercambio iónico, hasta $35\ 928 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ con la cromatografía de interacciones hidrofóbicas; lo cual representó un incremento de aproximadamente 17 veces de la actividad específica de la proteína. La identidad de la SKC-2 fue verificada mediante la secuenciación de su extremo amino, el cual fue idéntico al esperado por la secuencia nucleotídica. También se determinó el máximo de absorción UV de la SKC-2 purificada, que fue estimado en los 277 nm. Dado que la SKC-2 secretada por *S. lividans* TK24 fue purificada a escala de laboratorio al 90 % de pureza existen aún posibilidades de lograr una purificación de la SKC-2 con mayor pureza y con ello incrementar la actividad específica de la proteína. Las concentraciones de la SKC-2 secretada alcanzaron hasta $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cuando la cepa recombinante fue cultivada en el medio BTSB siguiendo un procedimiento de fermentación por lote no optimizado a escala de banco. Queda, por tanto, abierta la posibilidad de continuar incrementando las cantidades de la SKC-2 secretada a través de la optimización de la fermentación de *S. lividans* [pOVsiSK].

En Cuba, existe un proceso establecido para la producción de la Heberkinasa® a partir de *E. coli*. Sin embargo, este proceso de obtención tiene la desventaja que la SKC-2 se obtiene insoluble y biológicamente inactiva en cuerpos de inclusión, lo cual requiere de procesos de ruptura celular, extracción y renaturalización *in vitro* para la solubilización y el repliegamiento adecuado de esta biomolécula. Debido a que ocurren pérdidas considerables de las proteínas, estos procesos son reconocidos por la industria biotecnológica como un paso limitante en la obtención de proteínas recombinantes en *E. coli*. La expresión intracelular en *E. coli* presenta otra serie de desventajas operacionales. Entre ellas, se encuentra la presencia de polímeros contaminantes a lo largo del proceso de purificación, como los lipopolisacáridos de la pared celular (LPS), los ácidos nucleicos y las proteínas del hospedero. Precisamente, los LPS son moléculas muy inmunogénicas y su presencia aún en cantidades trazas representa un gran problema para la producción de proteínas terapéuticas. En cambio, la obtención de la SKC-2 biológicamente activa en el medio extracelular de *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] permitió purificar la proteína en condiciones no desnaturilizantes. Este proceso de purificación de la SKC-2 requirió menor cantidad de etapas al compararlo con el sistema de obtención insoluble de la SKC-2 en *E. coli*. Además, *S. lividans* TK24 es un hospedero no patógeno y no posee LPS en su estructura celular, lo que hace su empleo aún más atractivo.

En este trabajo, también se construyó un vector plasmídico denominado pUCA, para portar el promotor de resistencia a eritromicina de *S. erythraea ermE** y las señales traduccionales y de secreción de la lipasa A de *S. exfoliatus*. Este vector fue utilizado para evaluar la expresión secretoria del IFN α 2b y la SKC-2 en *S. lividans* TK24. Ambas proteínas fueron translocadas al medio extracelular cuando fueron fusionadas al LipA-sp, pero las concentraciones fueron bajas. Posteriormente, se demostró que el péptido señal de la lipasa A promueve la translocación de proteínas a través de un mecanismo no dependiente del proceso Tat; lo cual, de acuerdo con el estado del arte actual, sugiere que este péptido señal promueve la secreción de proteínas a través de la vía Sec.

El IFN α 2b fue secretado biológicamente activo al medio extracelular de *S. lividans* TK24 a concentraciones $< 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Estos niveles de expresión son bajos, pero aún quedan posibilidades por explorar para incrementar la cantidad del IFN α 2b; entre ellas, la evaluación de otros péptidos señales para dirigir la secreción de esta biomolécula y la adaptación de codones no óptimos del gen *ifn α 2b* al uso de codones de *Streptomyces*.

La tesis doctoral consta de cuatro capítulos, cada uno de ellos describe después de la introducción los aspectos siguientes: Revisión bibliográfica, la cual se dedica al desarrollo de las bases del conocimiento actual sobre la secreción de proteínas en *Streptomyces* y en *Escherichia coli*, como exponente bacteriano mejor caracterizado. Además, analiza los factores y elementos moleculares más importantes que pueden influir en la producción secretoria de proteínas heterólogas en *Streptomyces* y hace una reseña histórica sobre la obtención recombinante de las proteínas IFN α 2b y SKC-2 por otras bacterias y levaduras; el diseño metodológico incluye tanto la descripción detallada del material biológico utilizado, los procedimientos utilizados en el trabajo con *Streptomyces* y los procedimientos y técnicas empleadas para evaluar la expresión y secreción de las proteínas de interés por las cepas de *S. lividans* recombinantes; los resultados igualmente revelan tanto el análisis de la expresión y secreción de las proteínas por las cepas de *S. lividans* recombinantes, como la purificación y caracterización de la SKC-2 soluble derivada de *Streptomyces*; en el análisis de los resultados se realiza una detallada discusión de forma comparativa de la obtención de la SKC-2 a partir de *S. lividans* con el proceso actual a escala industrial de obtención de la Heberkinasa® a partir de *E. coli* y se enfatiza en las ventajas operacionales de su obtención a partir de *S. lividans*. Todos estos aspectos se desarrollan en 98 páginas, en las que se incluyen 255 referencias bibliográficas, seis tablas y 30 figuras. El 13 % de la bibliografía corresponde al período 2005 a 2009; el 22 %, al cuatrienio 2004 a 2000 y el 25 %, a las citas comprendidas entre 1999 y 1995. En la tesis se presentan 9 publicaciones de la autora relacionadas con la utilización de *Streptomyces* como hospedero para la expresión secretoria de proteínas de interés biofarmacéutico, cuatro de las cuales se relacionan con los resultados presentados en la tesis, destacándose la publicación en la revistas *Microbial Cell Factories* (2007). Este trabajo igualmente ha sido presentado en foros internacionales y nacionales desde 2002, entre los que se destacan, el Tercer Congreso de Microbiólogos Europeos FEMS 2009, Gothenburg, Suecia; los Congresos Biotecnología Habana 2006 y 2003; el XXVII Congreso Latinoamericano de Química y VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, 2006, La Habana; el II Encuentro Interamericano de Farmacia y Nutrición, 2003, La Habana; el 14. Congreso Científico CNIC, 2005, La Habana, y el X Congreso Internacional de Bacteriología y Microbiología Aplicada, 2002, París, Francia. Entre los avales de esta tesis se encuentran los premios al "Trabajo de Mayor Originalidad del Centro de Química Farmacéutica" en los años 2002 y 2007 y los premios al "Resultado Relevante del Centro de Química Farmacéutica" en los años 2002 y 2007.

El sistema hospedero *S. lividans* TK24 [pOVsiSK] puede servir de punto de partida para el establecimiento de una producción de la SKC-2 a mayor escala. La estreptoquinasa es el más económico de los trombolíticos empleados actualmente y si se lograra un proceso de producción más seguro para el personal productor o más sencillo pudiera bajar el costo de su producción y llegar a ser más accesible a los pacientes que la necesiten.