

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E  
PESQUISA  
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
NÍVEL MESTRADO**

**Uso de sistemas virais citoplasmáticos de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de proteínas heterólogas**

**QUELI DEFAVERI VARELA**

**CAXIAS DO SUL**

**2008**

**QUELI DEFAVERI VARELA**

**Uso de sistemas virais citoplasmáticos de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de proteínas heterólogas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

**Caxias do Sul**

**2008**

**QUELI DEFAVERI VARELA**

**Uso de sistemas virais citoplasmáticos de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de proteínas heterólogas**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia”

---

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 DE NOVEMBRO DE 2008**

**Comissão examinadora:**

---

**Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare-UCS**

---

**Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon- UCS**

---

**Prof. Dr. Luiz Augusto Basso- PUC**

*“Dedico este trabalho a todos aqueles que me incentivaram a sempre buscar algo mais, a não acreditar em receitas prontas, a experimentar, em especial ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão e ao meu namorado.”*



Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Genética Toxicológica do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. O projeto foi subsidiado pela Fundação de Amparo e Incentivo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS- 002/2005-PROADE3).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diego Bonatto, que esteve presente em todas as etapas deste trabalho, que acreditou e confiou em mim, que me ensinou muito, e que faz da pesquisa mais do que uma profissão, uma vocação, muito obrigada!

À professora Dra. Mirian Salvador com quem tive os meus primeiros contatos na pesquisa, que sempre se mostrou disponível, e que foi uma ótima orientadora nos quatro anos em que convivi no Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes.

Ao professor Dr. José Luiz Piazza, o Duda, que durante a graduação sempre me encantou com suas maravilhosas aulas de Química Orgânica e que me ajudou num dos momentos mais difíceis do mestrado, o nivelamento.

Ao professor Dr. Luiz Augusto Basso por fazer parte da comissão de acompanhamento deste trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Echeverrigaray, que fez parte da comissão de acompanhamento deste trabalho e contribuiu muito com suas sugestões.

Ao Laboratório de Estresse Oxidativo, ao Laboratório de Microbiologia e ao Laboratório de Microbiologia Vegetal pela parceria estabelecida, pelo auxílio, muito obrigada!

Aos colegas de mestrado, em especial aos amigos de todas as horas, Gustavo, Manoela, Fernanda e Nadine, muito obrigada, vocês são muito especiais!

Aos demais colegas do Laboratório de Genética Toxicológica pela maravilhosa convivência e cooperação.

À bolsista de iniciação científica Janine Boniatti, pela dedicação, competência e amizade.

À minha família, Nilson, Matilde, Leandro, pela paciência, compreensão, incentivo, carinho, enfim, vocês são tudo para mim! Muito, muito obrigada!

Ao meu namorado, Dino, pelo amor, carinho e compreensão, pelo intercâmbio de idéias, por participar ativamente deste processo com muita paciência, muito obrigada!

Agradeço a todos os meus professores, pelos exemplos, pelo conhecimento transmitido.

Agradeço aos demais funcionários do Instituto de Biotecnologia.

Em especial, aos demais amigos, familiares que sempre torcem por mim!  
Obrigada!

À CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro que foi primordial na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do qual eu me orgulho muito de fazer parte!

Muito obrigada!

## ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se dividida da seguinte forma: uma introdução geral, os objetivos geral e específicos, um artigo de revisão escrito conforme as normas da revista a que será submetido, a minuta da propriedade intelectual depositada, material e métodos, resultados e discussão complementares, conclusões e perspectivas.

A introdução geral aborda conceitos importantes no entendimento da expressão de proteínas heterólogas bem como a relação destes com sistemas virais citoplasmáticos de *Saccharomyces cerevisiae*.

O primeiro capítulo, intitulado “Uso de sistemas virais e fatores relacionados ao hospedeiro de *Saccharomyces cerevisiae* como uma nova ferramenta biotecnológica” trata de uma revisão sobre os sistemas virais presentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, suas interações, as relações com o hospedeiro, os fatores intrínsecos ao hospedeiro nesta relação, bem como o seu potencial biotecnológico no desenvolvimento de vacinas, síntese protéica ou mesmo elucidação de comportamentos e relações entre o parasita e seu hospedeiro. Esta revisão será submetida a um periódico da área.

O segundo capítulo, intitulado “Desenho e Construção Gênica compreendendo Sistemas Virais, Célula Transformada, Método de Expressão de Peptídeos e/ou Proteínas Heterólogas Fusionadas ou Não e Composição Compreendendo o Mesmo”, trata-se de um pedido de patente, atualmente depositado no INPI (INPI 020080110888). Este pedido tem como base o patenteamento de uma técnica de expressão viral de proteínas ou peptídeos heterólogos desenvolvidos no decorrer deste mestrado.

Nos adendos são apresentados os seguintes itens: “Material e Métodos” e “Resultados Complementares, Discussão, Conclusão e Perspectivas” que constam de forma resumida no pedido da patente. Além destes, também é apresentado um anexo que contempla um artigo de revisão em fase de redação intitulado “*Interleukin-2, new*



*clinical applications and properties*” o qual trata de uma revisão sobre o papel da interleucina-2 na imunomodulação, suas novas aplicações clínicas, propriedades, vislumbrando esta como uma citocina de importante relevância clínica e de grande valor econômico, esta revisão será submetida a um periódico da área.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>71</b>
<b>ADENDO I.....</b>	<b>75</b>
<b>ADENDO II.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>136</b>

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

**Tabela 1:** Espécies de leveduras utilizadas no desenvolvimento de vacinas

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1. Via de secreção das toxinas *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*.** Após a translação da sequência pré-pró-toxina (pptox) da fita (+)ssRNA (representado pela seta dobrada), a proteína é importada no lúmen do retículo endoplasmático (ER), onde a sequência pré é clivada por meio de uma peptidase específica (SP). A pró-toxina (ptox) então vai até o complexo de Golgi, onde a sequência pró e a região  $\gamma$  são removidas por Kexp peptidases e a toxina madura heterodimérica ( $\beta/\alpha$ ) é formada dirigindo-se posteriormente às vesículas secretórias. Símbolos: PM, membrana plasmática; CW, parede celular.

**Figura 2. Ciclo de replicação do vírus L-A e seu satélite ScV-M1.** Ambos os vírus competem pelas dsRNA proteínas virais Gag e Gag-Pol, as quais são codificadas por um (+)ssRNA transcrito do genoma do L-A. Estas duas proteínas são essenciais à estrutura da partícula viral para o empacotamento do (+)ssRNA viral; para a replicação do (+)ssRNA, o qual gera dsRNA; e para transcrição do dsRNA, o qual por sua vez gera novas cópias do (+)ssRNA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AbMV	<i>Abutilon mosaic geminivirus</i>
BMV	<i>Bromo mosaic virus</i>
BPV1	<i>Bovine papillomavirus type 1</i>
CIRV	<i>Carnation italian ringspot virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DCs	<i>Dendritic cells</i>
DI	<i>Defective interfering</i>
dsRNA	<i>Double-strand RNA</i>
EXL	<i>Excluder</i>
FHV	<i>Flock house virus</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HbsAg	<i>Surface antigens of hepatitis B virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV-1	<i>Immunodeficiency virus type 1</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HOK	<i>Help of killer</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
IN	<i>Integrase</i>
MAK	<i>Maintenance of killer</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MYMIV	<i>Mungbean yellow mosaic india virus</i>
NEX	<i>Nonexcludable</i>

NoV	<i>Nodamura virus</i>
NS5a	<i>Non-structural protein 5a</i>
NTR	<i>Non-translated region</i>
ORF	<i>Open reading frames</i>
PP2A	<i>p-53 independent protein phosphatase 2a</i>
Pptox	<i>Pré-pró-toxina</i>
PUUV	<i>Puumala hantavirus</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
SKI	<i>Superkiller</i>
ssRNA	<i>Single strand RNA</i>
TBSV	<i>Tomato bushy virus</i>
VBS	<i>Virus binding sites</i>
VLP	<i>Virus like particles</i>

## RESUMO

A produção de proteínas e peptídeos heterólogos representa um dos mais importantes segmentos do setor biotecnológico. Apesar das diferentes tecnologias hoje disponíveis para a (bio) síntese de proteínas e peptídeos (como a síntese química ou o emprego de microrganismos, animais e plantas transgênicos), nenhuma destas é capaz de produzir uma quantidade suficiente de proteínas e peptídeos para suprir as necessidades do mercado por apresentarem altos custos de produção e comercialização. Diante disso, este projeto visou utilizar os sistemas genéticos alternativos ou não convencionais existentes nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de peptídeos e proteínas heterólogas em larga escala, com um alto grau de pureza necessário às aplicações clínicas e com um custo de produção relativamente baixo para uso comercial. Estes sistemas não convencionais, representados especialmente por partículas virais intracelulares de *S. cerevisiae*, são conhecidos há várias décadas por conferirem o fenótipo *killer* em diferentes linhagens de leveduras, tanto para os isolados ambientais quanto para as linhagens utilizadas industrialmente. As características moleculares destes sistemas virais são bem conhecidas, sendo que os genomas dos diferentes tipos de partículas virais de *S. cerevisiae* já foram completamente seqüenciados. Assim, este trabalho avaliou a capacidade de leveduras industriais e laboratoriais em produzir proteínas e peptídeos heterólogos funcionais utilizando para tanto, um sistema viral naturalmente presente na levedura, que compreende um mutante natural do vírus *helper* L-A denominado de sistema viral X de *S. cerevisiae*.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, sistemas virais, proteínas heterólogas, vírus X.

## ABSTRACT

The production of heterologous proteins and peptides represents one of the most important segments of the biotechnology industry. Despite the different technologies available today for (bio) synthesis of proteins and peptides (such as chemical synthesis or the use of microorganisms, transgenic animals and plants), none of these are capable of producing sufficient quantities of proteins and peptides to the needs of the market because they present high costs of production and marketing. Thus, this project aims to use the alternative genetic systems or unconventional existing in the cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of heterologous proteins and peptides on a large scale, with a high degree of purity needed for clinical applications and at a cost of production compared low for commercial use. These non-conventional systems, particularly represented by intracellular viral particles of *S. cerevisiae*, are known for several decades to give the killer phenotype in different strains of yeast, both for environmental isolates and to the strains used industrially. The molecular characteristics of these viral systems are well known, and the genomes of different types of viral particles from *S. cerevisiae* have been completely sequenced. Thus, this work assessed the capacity of industrial and laboratory yeasts to produce heterologous proteins and peptides using a viral system naturally present in yeast that is a natural mutant of the helper virus L-A, called X system of *S. cerevisiae*.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, viral systems, heterologous proteins, virus X.



## INTRODUÇÃO GERAL

Um dos grandes desafios da indústria biotecnológica tem sido a busca por meios de produção alternativos de proteínas e peptídeos heterólogos em quantidades e grau de pureza adequada, visto que os meios atualmente empregados possuem um custo de produção muito elevado devido à tecnologia envolvida nos processos e à sua baixa produtividade (Latham, 1999).

Felizmente, inúmeros avanços na área biotecnológica têm tornado a obtenção de peptídeos e proteínas economicamente mais viável, onde uma das soluções biotecnológicas para a síntese de peptídeos/proteínas é o uso de animais e plantas transgênicos. Entretanto, devido às inúmeras preocupações técnicas, éticas e sócio-econômicas que existem em relação aos organismos multicelulares transgênicos, a produção de peptídeos e proteínas em escala comercial, utilizando estes organismos, continua em caráter experimental (Latham, 1999).

Ao contrário das plantas e animais transgênicos, os microrganismos possuem uma longa história de uso para a produção de peptídeos e proteínas heterólogas (Baneyx, 1999; Pfeifer & Khosla, 2001). Vários microrganismos, tanto procarióticos quanto eucarióticos, apresentam ferramentas moleculares bem desenvolvidas que tornam a produção destas moléculas muito mais viável economicamente do que os métodos baseados em síntese química (Baneyx, 1999; Ostergaard *et al.*, 2000; Pfeifer & Khosla, 2001). Neste sentido, as leveduras possuem um papel importante para a produção de peptídeos/proteínas heterólogas.

As leveduras são cultivadas em meios de cultura simples, possuindo uma enorme gama de ferramentas de manipulação molecular disponíveis para qualquer laboratório de Biologia Molecular. Além do mais, combinam a facilidade, a simplicidade e a economia dos sistemas de expressão heteróloga bacterianos com as

vantagens do processamento pós-traducional de proteínas encontrado em células animais e vegetais (Gellissen & Hollenberg, 1997; Houard *et al.*, 2002). Além destes, outro atrativo das leveduras é a sua capacidade de secretar pequenos peptídeos de natureza *killer*. O fenômeno, denominado de *killer*, foi descoberto em 1963 por Bevan e Makower ao trabalharem com uma linhagem de *S. cerevisiae* isolada de uma indústria cervejeira. Caracteristicamente, o fenótipo *killer* descrito por estes pesquisadores estava associado com a secreção de uma proteína de baixo peso molecular que, posteriormente, foi caracterizada como sendo uma toxina de natureza glicoprotéica (denominada de toxina *killer*) (Schmitt & Breinig, 2002).

A toxina *killer* pode matar células de diferentes espécies de *Saccharomyces* sem contato celular direto. Interessantemente, as linhagens *killer* são imunes a sua própria toxina, mas podem ser sensíveis a diversos tipos de toxinas excretadas por outras linhagens. Por outro lado, várias linhagens de *S. cerevisiae*, as quais perderam a sua capacidade de excretar a toxina, permanecem imunes (Schmitt & Breinig, 2002). Desta forma, o fenótipo *killer* (compreendendo a secreção da toxina e a sua respectiva imunidade), é comumente encontrado em isolados naturais de leveduras, bem como em coleções ou bancos de germoplasma de microrganismos (Abranches *et al.*, 1997). Em seu ambiente natural, o fenótipo *killer* confere uma grande vantagem na competição por nutrientes em relação às linhagens sensíveis (Young & Yagiu, 1978; Abranches *et al.*, 1997). Por sua ampla distribuição em *Saccharomyces*, o fenótipo *killer* também está presente em outros gêneros de leveduras, tais como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces*, demonstrando assim a sua importância ecológica para o grande grupo das leveduras (Schmitt & Breinig, 2002).

Graças a esta ampla distribuição taxonômica, a base genética da expressão do fenótipo *killer* é bastante diversificada, podendo ser vírus de fita dupla de RNA (dsRNA) encapsulados (Bostian *et al.*, 1984), plasmídeos lineares (Gunge *et al.*, 1981; Worshan & Bolen, 1990) ou mesmo genes nucleares (Suzuki & Nikkuni, 1994). Em *S. cerevisiae*, o fenômeno *killer* se dá por vírus de dsRNA, os quais seguem um padrão não-mendeliano de transmissão vertical (Schmitt & Breinig, 2002). A presença destes vírus na célula de levedura não origina nenhum sintoma, diferente de outros micovírus relacionados ao envelhecimento precoce e a distúrbios celulares em fungos filamentosos (Schmitt & Breinig, 2002). Interessantemente, todos os vírus de dsRNA de *S. cerevisiae* são considerados não-infectivos por não possuírem uma rota de infecção extracelular, o que levou à denominação de “vírus crípticos” ou partículas parecidas com vírus (do inglês *virus-like particles* – VLPs) (Wickner, 1996).

Devido a sua forma não usual de infecção, as linhagens sensíveis podem adquirir o fenômeno *killer* desde que ocorra a fusão de células e/ou de pseudo-hifas ou mesmo o acasalamento com linhagens *killer* (Wickner, 1996; Magliani *et al.*, 1997).

São diversas as áreas onde se pode aplicar os produtos obtidos por meio do sistema *killer*, desde as vantagens na indústria de fermentações, onde seu uso se dá no combate à leveduras contaminantes, tanto na obtenção de vinho, cerveja ou mesmo pão (Meinhardt *et al.*, 1990). Como agentes de preservação em alimentos, no desenvolvimento de novos antimicóticos (Buzzini & Martini, 2001) e mesmo como uma ferramenta biotecnológica para tecnologias de DNA recombinante, onde seu uso então pode se expandir ainda mais. Por meio desta tecnologia, a síntese de proteínas heterólogas se torna muito atrativa mediante as condições de custo e produção (Heintel *et al.*, 2001).

Por outro lado, o sistema de secreção mediado pelas seqüências pré e pró da toxina *killer* foi empregado para a produção extracelular de proteínas heterólogas. Por exemplo, Skipper *et al.* (1985) demonstraram que a secreção de uma carboximetilcelulase de *Cellulomonas fimi* em *S. cerevisiae* foi altamente eficiente quando o gene que codifica para esta proteína foi fusionado às seqüências pré e pró da toxina K1. Recentemente também foi demonstrado que as mesmas seqüências peptídicas da toxina K28 são plenamente funcionais em *Schizosaccharomyces pombe*, permitindo a secreção de proteínas heterólogas neste organismo (Heintel *et al.*, 2001).

O sistema viral M compreende uma família de vírus representada por M1 (ScV-M1), M2 (ScV-M2) e M28 (ScV-M28), estes são encapsulados em VLP que são sintetizados por meio das proteínas de outro vírus presente na levedura denominado de L-A. O vírus X por sua vez, é um mutante natural do vírus L-A e compete com o vírus M pelas suas proteínas de empacotamento viral (produzidas pelo vírus *helper* L-A), a presença destes vírus não confere nenhum fenótipo detectável na levedura. Estes sistemas virais ScV-X, ScV-M1 e ScV-M28, como são sistemas naturais de expressão, poderiam ser utilizados como sistemas de expressão de proteínas de interesse biotecnológico, estes por sua vez apresentam vantagens e desvantagens importantes que se encontram listadas abaixo:

#### Vantagens para o uso biotecnológico do ScV-X/ ScV-M1/ ScV-M28

1. Sendo um sistema de replicação autônoma presente no citoplasma da célula, o mesmo não está sujeito às regulações de expressão gênica nuclear, incluindo, neste caso, possíveis silenciamentos gênicos ou efeitos epigenéticos que diminuem a expressão gênica e, conseqüentemente, a quantidade final de proteína heteróloga por biomassa obtida;

2. As seqüências M-ssRNA(+) se apresentam em um número de cópias muito maior do que qualquer outro ssRNA codificado por genes nucleares. Por sua importância para a célula na competição por nutrientes, como foi salientado acima, as fitas simples virais, tanto do ScV-M quanto do L-A, perfazem um total de 0,1% de todos os ácidos nucléicos presentes na célula;

3. Sendo um sistema viral não danoso para a célula, e por apresentar um padrão de segregação não-mendeliana, não há a necessidade de manter uma pressão de seleção constante na célula para conservar os níveis adequados de expressão gênica, tal como ocorre com vetores de alta expressão. Neste sentido, o sistema VLP é mais simples e mais eficiente para expressar altos níveis de proteínas heterólogas, seja em meios completos contendo fontes de carbono/nitrogênio industrialmente mais acessíveis, seja em meios definidos, próprios para a obtenção de proteínas para uso veterinário e humano.

4. A presença de seqüências de processamento pós-traducionais tornam o sistema VLP atrativo para a expressão e secreção de proteínas humanas ativas e em grandes quantidades, as quais requerem extensivas modificações pós-traducionais, tais como N-glicosilação, fosforilação e acetilação;

5. Sem a necessidade de manter pressões seletivas no meio de cultura, o uso de linhagens ditas “normais” ou não laboratoriais expressando VLPs contendo genes de interesse biotecnológico possui um atrativo significativo para a indústria de base biotecnológica. Estas linhagens, como as empregadas na indústria cervejeira ou na panificação, podem atingir altas concentrações de biomassa em um tempo menor de fermentação quando comparadas com as linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae*. Além disso, as linhagens industriais podem utilizar, de forma muito mais eficiente, fontes de carbono complexas, tais como melaço de cana-de-açúcar.

### *Desvantagem do sistema VLP para uso biotecnológico*

Apesar de suas vantagens, o sistema VLP possui uma desvantagem que pode limitar a sua utilização. Neste caso, o tamanho da ORF ou cDNA, o qual codifica a proteína de interesse, não deverá ser maior do que 3 kb. Levando-se em conta que o genoma viral do L-A possui um tamanho de 4,6 kb, e assim como acontece na maioria dos vírus conhecidos, genomas muito grandes não são corretamente empacotados (Wickner, 1992). Desta forma, o tamanho do gene ou cDNA é um fator importante que deverá ser levado em conta para a expressão viral.

Assim, poderia-se pensar no uso do próprio VLP como um sistema de produção de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae*. Por estas razões, neste projeto, se propôs o uso de sistemas virais naturais presentes na levedura, como é o caso do Sistema X (ScV-X) e do sistema M, aqui representado pelo M1 e M28 (ScV-M1 e ScV-M28).

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Verificar se os sistemas virais citoplasmáticos de *Saccharomyces cerevisiae* M1, M28 e X, modificados *in vitro*, poderiam expressar e excretar eficientemente, em linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae*, peptídeos e proteínas heterólogos em meios de cultura completos e definidos, em ausência de qualquer pressão de seleção externa, seja esta química ou física.

### Objetivos específicos

1. Construir sistemas de transcrição *in vitro* contendo o cDNA do ScV-M1 ou ScV-M28 fusionados ao gene *URA3* de *S. cerevisiae*, controlados pelo promotor do bacteriófago SP6. Os sistemas foram denominados de ScVURAM-I (para expressão viral intracelular de Ura3p) e ScVURAM-E (para a produção viral e secreção de Ura3p no meio de cultura);
2. Construir sistemas sintéticos de expressão de RNA em *S. cerevisiae* utilizando, para tanto, a seqüência viral comumente presente em leveduras denominada de “X”, a qual é fusionado o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* ou GFP). Esse sistema, denominado de “Y3.0”, foi colocado sob o controle do promotor SP6;
3. Introduzir, em esferoplastos de *S. cerevisiae*, os transcritos fita simples de RNA Y3.0, ScVURAM-I e ScVURAM-E;
4. Analisar a estabilidade dos transformantes em meios de cultura completos e definidos;
5. Quantificar a expressão da proteína GFP por meio de microscopia de fluorescência e espectrofluorimetria.

# **Capítulo 1**

**Uso de sistemas virais e fatores associados ao hospedeiro de  
*Saccharomyces cerevisiae* como uma nova ferramenta biotecnológica**

**Manuscrito em fase de redação a ser submetido para um periódico da  
área**



**Uso de sistemas virais e fatores associados ao hospedeiro de  
*Saccharomyces cerevisiae* como uma nova ferramenta biotecnológica**

Queli Defaveri Varela, Gabriela Criveletto and Diego Bonatto \*

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS,  
Brazil.

**Short title: *S. cerevisiae* viral systems**

**\*Address to which correspondence should be sent:**

Diego Bonatto

Laboratório de Genética Toxicológica - 206

Instituto de Biotecnologia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Universidade de Caxias do Sul - UCS

Rua Francisco Getúlio Vargas 1130 – Bloco 57

Caixa Postal 1352

Caxias do Sul – Rio Grande do Sul

Brazil

95070-560

Phone: 55-54-3218-2682

Fax: 55-54-3218-2293

E-mail: diegobonatto@gmail.com

Contract/grant sponsor: CNPq, FAPERGS.

## **Resumo**

Sistemas virais simbióticos de diferentes famílias estão presentes em praticamente todos os organismos. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* existem famílias virais dsRNA, incluindo L-A, L-BC, M, T e W, e famílias virais ssRNA, como 20S e 23S. As associações virais como as entre o vírus M e o vírus L-A formam o que é denominado de sistema *killer*, o qual tem sido extensivamente estudado. Os resultados destes estudos têm sido utilizados para elucidar o comportamento viral e as relações entre parasita-hospedeiro, bem como no desenvolvimento de proteínas heterólogas e vacinas. Aqui, nós revisamos os sistemas virais associados à *Saccharomyces cerevisiae*, e discutimos o seu uso como uma nova ferramenta biotecnológica no desenvolvimento de vacinas e estratégias antivirais, na pesquisa de virologia básica e na expressão de proteínas heterólogas.

**Palavras-chaves:** levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, sistema *killer*, sistemas virais

## Introdução

A produção de proteínas e peptídeos heterólogos é um dos mais importantes segmentos da indústria biotecnológica avançada. Apesar das diferentes tecnologias atualmente disponíveis para (bio) síntese de proteínas e peptídeos, tais como síntese química ou a utilização de microrganismos, plantas e animais transgênicos, os cientistas continuam a sua busca por um modelo ideal para a expressão de proteínas heterólogas.

Essa busca por um organismo ideal para a síntese protéica heteróloga levou muitos pesquisadores a utilizarem a levedura, a fim de explorar as suas vantagens biotecnológicas. Neste contexto, os sistemas virais presentes em fungos filamentosos e leveduras tornaram-se objeto de vários estudos de caráter básico e aplicados.

A produção de exotoxinas com atividade antibiótica mediada por receptores celulares de parede específicos é um fenômeno relativamente comum na natureza. Desde a descoberta do fator *killer* de leveduras (que compreende a secreção de uma toxina *killer* e imunidade contra a mesma codificada por um vírus denominado de M) este fenômeno foi identificado em um grande número de gêneros e espécies de leveduras [1].

A produção das toxinas *killer* é uma estratégia intra e interespecífica que a levedura utiliza para restringir o crescimento de competidores [2] e está associado à presença de um dsRNA viral, DNA linear, plasmídeos, ou genes nucleares em algumas leveduras [3]. Sistemas virais estão presentes em diferentes espécies de leveduras e o conhecimento destes sistemas permite o desenho de novas estratégias antivirais, as quais se apresentam promissoras no desenvolvimento de vacinas no futuro. Uma importante vantagem do sistema de expressão viral da levedura frente aos sistemas convencionais de expressão é a sua via de secreção. Esta via permite o isolamento de grandes quantidades de proteínas heterólogas expressas. Assim, o objetivo desta revisão

é fornecer uma visão geral do uso da levedura *S. cerevisiae* como um organismo hospedeiro para a produção de proteínas e vírus, e o uso do sistema *killer* em aplicações biotecnológicas.

### **Sistemas virais de *Saccharomyces cerevisiae***

Na última década, *Saccharomyces cerevisiae* tem se tornado um organismo modelo popular para estudos de expressão gênica heteróloga e interações proteína-proteína *in vivo*. Em adição a estas diversas aplicações para o sistema de expressão da levedura, *S. cerevisiae* também tem sido utilizada extensivamente na pesquisa básica como um modelo celular eucarioto [4].

De qualquer forma, seu uso não se restringe apenas aos aspectos da pesquisa básica e aplicada. Um aspecto importante da pesquisa com *S. cerevisiae* é a classificação dos seus sistemas virais de acordo com os diferentes vírus de ssRNA e dsRNA que podem ser agrupados em diferentes famílias. De fato, mais de cinco diferentes famílias dsRNA podem ser encontradas em *S. cerevisiae*, denominadas L-A, L-BC, M, T, e W, três destas (L-A, L-BC, e M) são encapsuladas em partículas intracelulares *virus-like particles* (VLPs) [5]. Os VLPs de L-A e L-BC estão presentes em praticamente todas as linhagens de *S. cerevisiae* [6]. Dois ou mais vírus da mesma classe geralmente coexistem no mesmo hospedeiro sem que haja interferência entre eles [6].

L-A é um micovírus pertencente à família *Totiviridae*. A sua presença não confere nenhum fenótipo detectável nas células da levedura, nem mesmo a sua replicação ou manutenção requer a presença de nenhum outro vírus de levedura [7]. O vírus L-A é formado por um genoma de 4.6-kb dsRNA. Este RNA apresenta dois quadros abertos de leitura (ORF1 e ORF2), um sítio de ligação viral (VBS) localizado

400 bases acima dos 39 terminais, e um potenciador interno de replicação, o qual parcialmente sobrepõe-se com o VBS e o qual é necessário para que o RNA genômico tenha completa atividade. ORF1 (2.043 bases) codifica a proteína de empacotamento principal (Gag, 680 resíduos, 76 kDa), enquanto ORF2 (Pol, 868 resíduos, 100 kDa) codifica uma RNA polimerase [8]. A fusão gênica de ORF1 e ORF2 produz uma proteína Gag-Pol de 180 kDa. ORF1 e ORF2 sobrepõem em 130 bp e ORF2 apresenta um *frameshift* ribossomal -1 [8,9].

O domínio C terminal da fusão proteica (Pol) liga à fita simples de RNA [10]. Fitas positivas são sintetizadas por meio da transcrição do dsRNA, catalisadas pela RNA polimerase RNA-dependente vírus associada dentro das partículas virais. A fita positiva de ssRNA é então liberada das partículas e traduzida para produzir proteínas virais [11]. O domínio Pol da proteína fusionada Gag-Pol liga especificamente ao VBS na fita positiva, e o domínio Gag prioriza a polimerização de moléculas Gag livres para formar capsídeos, então permitindo o empacotamento de ambos os genomas virais e RNA polimerase [12].

O capsídeo do L-A é uma partícula esférica com diâmetro de 430 Å composta por 120 cópias de Gag [11,13], aproximadamente duas delas carregam a enzima Pol [14]. A sua superfície apresenta uma propriedade não usual de ser composta de 60 dímeros assimétricos [13]; por outro lado, a estrutura possui uma configuração convencional de um icosaedro de triangulação classe T1 [15]. Cada capsídeo funciona como uma peneira molecular, com aproximadamente 60 aberturas de diâmetro de 10-15 Å cada. Estas aberturas permitem a entrada e saída de todas as moléculas necessárias à síntese de dsRNA, e ainda protegem o genoma viral da ação de nucleases citoplasmáticas [16].

A família viral L-BC compreende uma família que inclui os vírus L-B e L-C de 4.6-kb dsRNAs, na célula, eles apresentam um número reduzido de partículas quando comparados ao L-A. O genoma de L-BC não apresenta homologia com o genoma do L-A [17]. A maioria das linhagens de *S. cerevisiae*, incluindo as linhagens *killer*, apresenta o genoma L-BC. Os vírus L-BC codificam a sua própria proteína capsídica de 82-kDa denominada VLBC-P1, a qual nas linhagens apresenta apenas o dsRNA de L-BC nos VLP do L-BC, *Saccharomyces cerevisiae* (ScV)-LBC *virus-like particles*. Se uma linhagem *killer* apresenta L-A, L-BC, e vírus M, as partículas ScV-M contém apenas VLP do L-A. Nestas linhagens é provável que cada VLP consista de um único tipo de capsídeo, e que cada L dsRNA seja encapsulado no mesmo tipo de capsídeo [18]. Por esta razão, os vírions do L-BC não reconhecem a região de replicação interna da fita positiva do L-A. Uma comparação direta entre os vírions de L-A e L-BC mostrou que cada um reconhece preferencialmente o seu próprio RNA para ligação, replicação e transcrição. Este comportamento sugere uma relação evolucionária próxima entre os vírus de levedura, o que se confirma por meio das sequências similares das suas RNA-polimerases RNA-dependentes [19].

Para poder liberar o produto da tradução e formar VLPs, o vírus L-A desencapa o mRNA celular a fim de traduzir o seu próprio mRNA desencapado [20]. O vírus L-A utiliza uma estratégia codificante e mecanismos de montagem viral e empacotamento que são similares aos utilizados por outros retrovírus [6,21,22]. A proteína fusionada está integrada na partícula viral quando a sua porção Gag se associa com moléculas Gag livres. Devido ao domínio Pol da proteína fusionada ligar fitas simples de RNA, esta associação também tem sido proposta por ativar o empacotamento da fita viral (+). A maioria da porção Pol é desnecessária para a incorporação de Gag-Pol nas partículas

virais mas a região N terminal de Pol é necessária para o empacotamento do RNA viral (Fig. 1) [22-24].

Os vírus satélites M dsRNAs compreendem uma família de moléculas de RNA presentes em VLPs de linhagens *killer* de *S. cerevisiae*. Eles dependem do vírus *helper* L-A para a sua replicação e encapsulamento [25], e são eles os responsáveis pelo fenômeno *killer*. As três toxinas *killer* são K1, K2, e K28, e são codificadas por diferentes dsRNAs: M1, M2, M28, respectivamente. Eles diferem em tamanho (1.8, 1.5, e 1.9 kb) e apresentam organização gênica similar, mesmo que não compartilhem nenhuma sequência de homologia [26]. A manutenção de M dsRNA depende da expressão de ambas ORFs do L-A, e essencialmente todas as variantes L-A e M dsRNA tem se mostrado intercambiáveis. Em infecções mistas, nas linhagens testadas, M1 exclui M2 de todas as linhagens *killer* [27,3].

O dsRNA do vírus M1 pode ser separado em dois tipos, baseado nas respectivas densidades M1-H (pesado) que contém duas cópias de dsRNA por partícula; e M1-L (leve), o qual contém uma molécula de dsRNA por partícula. M1-H libera no citoplasma todos os seus produtos como ssRNA, enquanto que M1-L retém alguns dos seus produtos com a partícula parcialmente como dsRNA e parcialmente como ssRNA. O genoma de ScV-M possui apenas uma ORF, a qual codifica uma pré-pró-toxina (pptox). Em média, o tamanho do dsRNA genômico ScV-M é de aproximadamente 1.6 kb [7].

A fita positiva (+) do ssRNAs do L-A e ScV-M contém sinais específicos de empacotamento na região 3' terminal e estes sinais são essenciais para replicação e empacotamento do dsRNA (Fig. 2) [28,29]. Além disso, ambos os genomas virais compartilham a mesma região terminal, a região canônica 5'-GAAAAA, a qual é de essencial importância para transcrição e tradução das proteínas *killer* virais [30].

Outro vírus que está presente em *S. cerevisiae* é conhecido como X, apresenta um dsRNA de 0.52 kb, e surge espontaneamente em linhagens não *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* que originalmente apresentam L-A e L-BC dsRNAs. X hibridisa com L-A, e a comparação direta do RNA de X com o RNA do L-A mostra que os primeiros 25 pares de base da região 5' e pelo menos os últimos 110 pares de base da região terminal são idênticos às regiões correspondentes terminais de L-A dsRNA [31]. O vírus X depende do L-A para sua manutenção na célula. X também é encapsulado em VLPs cujas proteínas de empacotamento principal são providas pelo L-A, e requerem muitos genes cromossômicos *MAK* (manutenção do fenótipo *killer*) para sua manutenção para M1 mas não para L-A [31]. X é propagado pelas proteínas codificadas pelo L-A e se encontra em número de 1 a 8 moléculas por partícula [31]. A fita positiva de X se liga especificamente a VLPs abertos e vazios e é convertida por estas partículas a X dsRNA. Os transcritos de RNA de clones de X cDNA e sequências derivadas carregando deleções tem sido preparadas *in vitro* utilizando RNA polimerases T7 e T3 e testadas para específicas ligações à VLPs. Os resultados indicam que a ligação se deve à sequência UUUGGCCAGG, localizada 370 bases em direção à extremidade 5' da fita positiva de X na região terminal. Esta sequência também está presente 140 bases da região 3' terminal da fita positiva de M1 (+) [32].

W é um vírus de dsRNA citoplasmático com tamanho de 2.5 kb; está presente em muitas linhagens laboratoriais e seu genoma é idêntico ao do 20S RNA, o qual é um ssRNA cuja amplificação é fortemente induzida sob condições de estresse. Interessantemente, nem W dsRNA nem 20S RNA parecem ser encapsulados em VLPs [33]. O genoma 20S RNA codifica apenas a sua RNA polimerase denominada de p91, e esta reside no citoplasma como um complexo ribonucleoproteico com p91 [34]. Assim como W, também existe um T dsRNA que codifica a sua própria RNA polimerase, cuja



sequência proteica apresenta homologia com a polimerase de W mesmo além da região bem conservada entre as RNAs polimerases RNA-dependentes. Estes dados sugerem uma origem comum para ambos VLPs. T dsRNA também apresenta um (+)ssRNA denominado 23S RNA. A amplificação de 23S RNA pode ser induzida em condições de estresse como choque térmico ou inanição [35]. 20S e 23S RNAs pertencem à família narnavirus, a qual é de vírus de RNA fita positiva que infectam *Saccharomyces cerevisiae*. Estes vírus foram originalmente descobertos como espécies de RNA cuja amplificação é induzida sob restrição de nitrogênio. O narnavírus 23S RNA apresenta um genoma viral de 2891 nucleotídeos que codifica somente a sua RNA-polimerase RNA dependente, p104, e que forma um complexo ribonucleoproteico com p104 *in vivo* [36]. 23S RNA vírus foram gerados em leveduras por meio de um vetor de expressão viral contendo a sequência viral completa cDNA. Utilizando este sistema, um sinal necessário à replicação foi identificado recentemente [37]. Recentes trabalhos têm apresentado evidências conclusivas de que 20S e 23S RNA são replicons independentes [34].

O sistema viral de leveduras apresenta mecanismos de regulação próprios, mas estes não são os únicos fatores que controlam a sua propagação e estabilidade, genes do hospedeiro também participam do controle deste processo. Dois grupos de genes do hospedeiro podem afetar a propagação de L-A e M1: os genes *superkiller* (*SKI*) e os genes de manutenção do fenótipo *killer* (*MAK*) genes. Os produtos dos genes *SKI2* a *SKI8* reprimem o número de cópias de M1 e a tradução do seu mRNA. Ski2, uma grande proteína da família das helicases também reprime L-A, L-BC, e 20S ssRNA replicons [38]. Os genes *SKI* parecem constituir um sistema antiviral do hospedeiro que é essencial à célula para reprimir a propagação viral [39,40]. Mais de 30 genes cromossomais *MAK* são necessários para propagação e manutenção do fenótipo *killer*.

Apenas *MAK3*, *MAK10*, e *PET18* são necessários para propagação do vírus L-A. O gene *MAK3* codifica uma N-acetiltransferase, a qual é provavelmente envolvida na N-acetilação de proteínas mitocondriais e é responsável pela acetilação da região N-terminal da proteína de empacotamento principal requerida pelos vírus L-A e M1 para as suas montagens virais [41]. O produto gênico de *MAK10* é necessário para o crescimento ótimo do fungo em fontes de carbono não fermentáveis [42]. O produto gênico de *PET18* é necessário para replicação do DNA mitocondrial e para o crescimento celular e provavelmente seja a partícula que associa com e contribui para a estabilidade dos vírions, assim como ocorre com o produto gênico de *MAK10* [43].

Três elementos genéticos não-Mendelianos que afetam os sistemas K1 e K2 podem ser encontrados nos vírus L. [HOK] (*helper of killer*) (H) é definido por sua habilidade de suportar de outra maneira a replicação de um mutante de replicação defectiva M1 [44], [EXL] (*excluder*) (E) é definido pela exclusão de M2 quando ambos são introduzidos em uma mesma célula e [NEX] (*nonexcludable*) (N) protege M2 da ação de [EXL] [45]. [HOK] e [NEX] estão presentes no mesmo elemento genético em uma forma denominada L-A-NH que está presente em muitas linhagens de levedura [46]. [MAK] (B) mutações refletem a habilidade de manter ou excluir M1 e M2 de diferentes tipos genéticos [47]. Tem sido demonstrado recentemente que no sistema *killer* K28, L28 é uma espécie L-A-H com atividade [HOK] mas sem atividade B [48]. Assim, leveduras *killer* e não *killer* podem conter pelo menos dois tipos de vírus L de entre os L-A-H, L-A-E, L-A-HN, e L-A-HNB. Cada um carrega consigo diferentes combinações de atividades genéticas, por exemplo, MAK L-A-HN carrega [HOK] e [NEX] e genes citoplasmáticos, e dependem dos produtos de *MAK3*, *MAK10*, e *PET18*. Os demais, L-B e L-C, não carregam [HOK] nem [NEX] e também não requerem

nenhum dos genes *MAK* testados, como *MAK3*, *MAK10*, ou *PET18*. [EXL] também está localizado em uma forma de L dsRNA denominada L-A-E [46].

### **O sistema *killer***

O sistema *killer* foi descoberto há praticamente 45 anos atrás [49], quando se descobriu que todas as linhagens *killer* secretavam uma proteína de baixo peso molecular de natureza glicoproteica denominada de toxina *killer*. Neste sentido, as leveduras *killer* produzem uma toxina à qual são imunes à sua atividade. A via secretória utilizada para secretar as toxinas é similar à via encontrada em organismos superiores (Fig. 1) [50].

Atualmente, as linhagens *killer* têm sido classificadas em três grupos principais: K1, K2, e K28, os quais são baseados em características moleculares das toxinas secretadas, os seus perfis *killer*, a falta de imunidade cruzada e os determinantes genéticos que os codificam. Eles consistem de linhagens com dsRNA que produzem toxinas, enquanto outras linhagens que produzem toxinas conhecidas como KHR e KHS são codificados por DNA cromossomal [51].

Estudos do sistema *killer* K1 de *S. cerevisiae* tem fornecido extensivas informações sobre micovírus, sua relação com o hospedeiro, as características fisiológicas e estruturais de fungos de células eucariotas. Os três tipos *killer*, K1, K2, e K28, são distinguidos pela ausência de imunidade cruzada e por certas propriedades das toxinas e mecanismos letais. Enquanto as toxinas K1 e K2 se ligam a glicanos na parede celular e disruptam as funções da membrana, a toxina K28 se liga a manana-proteína e inibe a síntese de DNA [52].

Como afirmado anteriormente, o sistema *killer* constitui-se num modelo de estudos único, sendo a infecção com o vírus L-A associada com a presença de um vírus satélite M RNA dupla-fita empacotado em um capsídeo que o vírus L-A produz. As toxinas K1, K2, e K28 são codificadas por diferentes vírus satélites citoplasmáticos RNA dupla-fita: M1, M2, e M28, respectivamente. Estas toxinas são encapsuladas em VLPs, e dependem de um outro grupo de vírus auxiliares de leveduras para sua replicação e encapsulamento. O vírus M é responsável pela atividade *killer* e auto-imunidade, uma característica das linhagens *killer* de levedura que produzem toxinas. Estas toxinas são capazes de matar todas linhagens não *killer*, assim como linhagens de uma classe *killer* diferente, as leveduras produtoras de toxinas permanecem imunes a sua própria toxina e àquelas produzidas por linhagens do mesmo grupo *killer* [3].

### **Aplicações do Sistema *killer***

Desde a descoberta do sistema *killer*, intensivos estudos têm fortalecido substancialmente o nosso conhecimento em diversas áreas da biologia e provido aprofundamentos nos aspectos básicos da biologia celular eucariota, assim como na relação e interação entre os vírus e seus hospedeiros, e aspectos gerais da virologia de leveduras. Apesar da sua importância para a compreensão geral da biologia celular eucariota, leveduras *killer*, toxinas *killer* e os vírus *killer* também estão despertando interesse para a sua possível aplicação na biomedicina e tecnologia de DNA recombinante [53].

Por exemplo, o sistema de *S. cerevisiae* torna possível estratégias de busca para agentes antivirais de fontes naturais. O desenho destes ensaios tira vantagem da habilidade do vírus L-A e seu satélite, o vírus M detectarem pequenas variações no *frameshifting* -1 ribossomal. Uma pequena mudança na eficiência do *frameshifting* pode

ser detectada por meio de mudanças fenotípicas, as quais podem ser observadas como zonas de clareamento numa placa de ágar [54]. De fato, um grupo de cientistas já iniciou um programa de buscas para identificar agentes antivirais naturais [4].

O sistema *killer* de leveduras pode ser um meio útil na identificação de organismos com o complexo *Nocardia asteroides* (*Nocardia asteroides*, *Nocardia farcinica*, e *Nocardia nova*). A variedade de *Nocardia* spp. pode causar infecções em humanos. As linhagens de *Nocardia* foram selecionadas aleatoriamente de isolados clínicos. Uma área clara de inibição do crescimento circundante às células de levedura demonstra um efeito *killer* positivo em *Nocardia* spp. [55]. Susceptibilidade à toxina pode ser generalizada entre microrganismos não relacionados às leveduras e talvez possa formar a base para um conveniente e adaptável método de identificação nos laboratórios de microbiologia [56].

Contudo, a aplicação mais importante para este sistema é a seleção de linhagens de levedura. Devido ao fato dos sistemas *killer* serem efetivamente protegidos e imunes a sua própria toxina, as leveduras *killer* possuem o potencial intrínseco de se tornarem dominantes no seu habitat natural [57]. Um novo sistema de expressão baseado em variantes do vírus L-A tem sido desenvolvido para permitir a montagem *in vivo* de VLPs quiméricos como a única plataforma para um diverso ramo de aplicações quer seja em diagnósticos, indústria de bebidas, expressão de sistemas virais heterólogos ou expressão de proteínas heterólogas. Assim, este sistema representa uma atrativa e útil ferramenta no desenvolvimento de vacinas e produção de proteínas recombinantes [58].

## ***Saccharomyces cerevisiae* como um modelo para compreender os fatores relacionados ao hospedeiro necessários para a montagem viral em algumas doenças**

Classicamente, proteínas virais tem tido uma abordagem voltada para tratamentos, e as pesquisas tem demonstrado interesse nos fatores associados ao hospedeiro, os quais podem ser eficientes marcadores contra diferentes grupos de vírus. A este respeito, tecnologias de busca podem ser úteis na seleção destes fatores que podem ser utilizados como marcadores para drogas.

Sistemas híbridos desenhados para células de *S. cerevisiae* têm sido utilizados com grande sucesso para estudar a relação e interação entre leveduras e seus parasitas. Por exemplo, estudos utilizando estes sistemas têm mostrado que interações RNA-RNA possuem um papel crucial em diferentes níveis do metabolismo celular, assim como no controle da replicação de plasmídeos, encapsulamento viral, transcrição e regulação da tradução [59].

Análises dos efeitos de vírus em processos celulares altamente conservados nas leveduras, como o controle do ciclo celular, apoptose, e degradação do mRNA tem contribuído para a atual compreensão da patogênese de patógenos virais importantes como o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e vírus da hepatite C (HCV). Por exemplo, a expressão de uma proteína heteróloga em *S. cerevisiae* tem se mostrado útil na compreensão de uma proteína não estrutural de HCV denominada 5a (NS5a), a qual tem sido fusionada na sua região N-terminal com o domínio de ligação de DNA (DBD) do ativador transcricional da levedura GAL4 (GAL4-DBD). Análises mutacionais adicionais de NS5a revelaram que a região entre os resíduos 130 e 352 é crítica para a ótima transativação. Esta região inclui dois domínios ácidos e uma região rica em prolínas, a qual tem sido envolvida na função de vários ativadores transcricionais [60].

*Saccharomyces cerevisiae* também tem sido utilizada como um sistema modelo para análise dos possíveis efeitos da núcleo-proteína no transporte núcleo-citoplasma. A núcleo-proteína de HCV é o principal componente do nucleocapsídeo viral e possui vários efeitos no metabolismo celular, regulação da transcrição, apoptose e transformação [61]. A núcleo-proteína, juntamente com a construção das quimeras HCV tem sido utilizada como um modelo para o estudo da tradução do HCV, e estes estudos têm reforçado as leveduras como uma valiosa ferramenta na pesquisa de HCV [62].

Leveduras também podem ser utilizadas como hospedeiros para suportar a replicação de genomas virais de eucariotos superiores [63]. A lista dos vírus de eucariotos superiores que se replicaram na levedura continua em expansão e inclui (+)RNA vírus, como RNA vírus que infectam plantas (como *carnation Italian ringspot virus* (CIRV) [64], *tomato bushy stunt virus* (TBSV) [65], e *cymbidium ringspot virus* (CymRSV) [66]) e animais (*flock house virus* (FHV) [67] e *nodamura virus* (NoV) [68]), assim como vírus de DNA que infectam humanos (*human papillomavirus* [69]), animais (*bovine papillomavirus* [70]), ou plantas (*mungbean yellow mosaic India virus*, MYMIV [71]).

### ***Saccharomyces cerevisiae* como um modelo para compreensão dos fatores relacionados ao hospedeiro necessários para a montagem de vírus de plantas**

A compreensão do comportamento viral em plantas possui uma importância econômica, devido ao fato de que muitas das infecções nas plantas resultam em perdas da produção e redução da qualidade nutricional dos produtos obtidos.

O primeiro vírus de organismo eucarioto superior que se replicou e encapsulou seu genoma em *S. cerevisiae* foi o *Brome mosaic virus* (BMV), um vírus de plantas de RNA fita positiva [(+)RNA]. BMV é um membro da super família *alphavirus-like* de

animais e plantas. Leveduras que expressam os genes de replicação de BMV RNA 1a e 2a suportam uma replicação RNA-dependente e transcrição de derivados BMV RNA3 [63]. Desde este trabalho, muitos outros estudos têm utilizado a levedura como um hospedeiro em infecções virais. O desenvolvimento de leveduras como hospedeiras para replicação de RNA interferente defeutivo (DI) associado com *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) tem provido esclarecimentos do papel das proteínas virais e de hospedeiros na replicação e recombinação [72]. A atividade das replicases virais tem sido modelada em células de plantas utilizando genomas de RNA que infectam plantas como CIRV [73]. Em adição, a compreensão da bioquímica da replicação do DNA em vírus de DNA de plantas como o *mungbean yellow mosaic India virus* (MYMIV) é importante para o desenvolvimento de novas estratégias antivirais [74].

A maioria dos begomovírus de plantas utiliza duas proteínas para transportar o seu DNA de célula a célula, BV1 e BC1. Para analisar melhor a interação destas duas proteínas de *Abutilon mosaic geminivirus* (AbMV) no núcleo da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), o domínio GAD do fator de transcrição *GAL4* foi utilizado, os autores concluíram que BC1 e BV1 não interagem [75].

Os domínios tRNA na terminação 3' de alguns vírus de plantas também podem ser carregados pelas histidil t-RNA sintetases, porém estas sintetases não são importantes para a síntese protéica. Este é o caso do *Tobacco mosaic virus* e seu vírus satélite, assim como para o *Turnip yellow virus* e BMV. A montagem dos complexos de replicação de RNA em membranas intracelulares é um passo essencial no ciclo de vida de vírus de fita positiva de RNA [76].



## ***Saccharomyces cerevisiae* como um modelo para a compreensão dos fatores associados ao hospedeiro necessários à montagem de vírus de animais**

A compreensão das etapas fundamentais do ciclo de vida viral, incluindo interações entre o vírus e seu hospedeiro, é essencial para o desenho de estratégias antivirais efetivas. Para sanar as dificuldades experimentais associadas às interações entre os vírus e seus hospedeiros, plataformas genéticas têm sido desenvolvidas para possibilitar a replicação viral em *S. cerevisiae*. O sistema inclui vírus com genomas de RNA e DNA que infectam plantas, animais e humanos. Utilizando metodologias disponíveis para análise genética de leveduras, o processo fundamental que ocorre durante a replicação viral tem sido elucidado [77].

Vírus que infectam animais têm sido expressos em *S. cerevisiae*. *Flock house virus* (FHV) é o mais extensivamente estudado da família *Nodaviridae* de (+) RNA [78]. Nodavírus estão entre os menores genomas de RNA conhecidos. Esta simplicidade genética facilita as pesquisas e o desenvolvimento de ferramentas chave requeridas para a utilização e compreensão deste modelo de vírus de (+) RNA. Nodamura e FHV são os melhores estudados membros da família *Nodaviridae*. O FHV que infecta insetos é o único vírus de eucarioto superior que tem apresentado sofrer um ciclo de replicação e produzir infecção na progênie de *S. cerevisiae* [79]. O genoma de nodavirus é composto de dois segmentos de RNA de senso positivo. RNA1 codifica uma RNA-dependente RNA polimerase e RNA2 o precursor do capsídeo proteico. Uma pequena subgenômica RNA3, a qual codifica a proteína não estrutural B1 e B2, é transcrita de RNA1 durante a replicação do RNA [80].

A montagem do complexo de replicação do RNA em membranas intracelulares é um passo essencial no ciclo de vida de vírus de (+) RNA. De qualquer forma, leveduras com uma deleção de Hsp70 co-chaperonas *YDJI* apresentaram uma dramática redução

na replicação de RNA em FHV, o qual foi devido a uma reduzida expressão da RNA polimerase viral [81].

Outro exemplo de expressão de um vírus de animal expresso em *S. cerevisiae* é o vírus influenza. Vírus influenza infecta vertebrados incluindo mamíferos e pássaros. O sistema de genética reversa de influenza tem permitido o estudo da estrutura e função dos fatores virais. Em contraste, pouco se sabe sobre os fatores associados ao hospedeiro envolvidos no processo de replicação. O desenvolvimento de um sistema de replicação e transcrição de genomas de fita-negativa de RNA do vírus influenza em *S. cerevisiae* tem se mostrado útil para estudos detalhados do mecanismo de replicação e transcrição do genoma viral de influenza [82].

A infecção por HCV representa um grave problema de saúde que acomete mais de 170 milhões de indivíduos no mundo. A expressão de uma RNA polimerase viral RNA-dependente (RdRp) em células de levedura, na ausência de outras proteínas virais, tem mostrado que esta enzima é necessária e suficiente para a iniciação da síntese de RNA na forma *cis* do RNA 3'-não-traduzido HCV [83].

Papilomavírus são vírus de DNA que normalmente replicam no epitélio escamoso estratificado de hospedeiros mamíferos, onde o genoma viral é encontrado como um plasmídeo nuclear. Em leveduras, a replicação epissomal do genoma dos papilomavírus provém um sistema geneticamente manipulável capaz de ser utilizado na investigação de fatores celulares necessários à replicação epissomal e talvez novos meios para geração de infecção pelo papilomavírus [77,84]. *S. cerevisiae* suporta a replicação do papilomavírus bovino tipo 1 (BPV1), bem como do papilomavírus humano tipo 16 (HPV16) [85]. De fato, a levedura suporta a replicação de outros genomas de papilomavírus: papilomavírus bovino tipo 1 e HPV6b, -11, -16, -18, e -31 são todos capazes de se replicar em ensaios de curto prazo por um período de 20 duplicações

celulares. Outro estudo mostrou que pseudovíriões produzidos em levedura são úteis para transdução *in vitro* e entrega gênica *in vivo* [86].

Como uma ferramenta para a compreensão do ciclo de vida viral, a levedura é um modelo versátil. A integração do DNA pró-viral no genoma da célula hospedeira é um passo essencial na replicação de retrovírus e é catalisada pela enzima viral denominada de integrase (IN). Estudos têm demonstrado que HIV-1 IN é letal quando expressa em células de levedura [87].

Em adição, a levedura *S. cerevisiae* tem sido utilizada como um modelo genético no estudo da cap guanina-N7 metiltransferase de poxvírus. Diferenças estruturais entre as enzimas de formação do cap de mRNA de humanos e poxvírus indicam que a formação de cap pode ser um importante marcador na descoberta de drogas anti-poxvírus. Análises genéticas e farmacológicas das enzimas cap requeridas *in vivo* nas quais a leitura depende da capacidade das enzimas virais catalisarem a síntese de cap. Pesquisadores têm utilizado os ensaios complementares com leveduras como ensaios iniciais num novo ciclo de varredura por alanina da subunidade catalítica. Deste modo, inúmeros novos aminoácidos que são críticos para a atividade da cap metilação *in vivo* têm sido identificados [88].

Sistemas envolvendo a levedura *S. cerevisiae* e a proteína de adenovírus E4 orf4 têm sido utilizados como modelos apoptóticos. Esta proteína tem mostrado induzir p-53 independente, proteína fosfatase 2A (PP2A)-dependente de apoptose em células transformadas [89]. A análise de candidatos antagonistas de inibidores de apoptose (IAP)- mediados tem sido efetuada utilizando leveduras reconstituídas com o fator ativador de apoptose de mamíferos Apaf-1. O mecanismo ativador de apoptose Apaf-1- em *S. cerevisiae* tem sido reconstituído tal que a presença de uma forma ativa de Apaf-1, juntamente com ambas caspase-9 e caspase-3 resulta em morte da levedura.

Utilizando este sistema, pesquisadores têm mostrado que diferente de DIABLO/Smac, outras proteínas que interagem com IAPs de mamíferos (TAB-1, Zap-1, Traf-1 e Traf-2) não antagonizam IAP-inibidores de caspase mediados [90].

O gene codificador da proteína nucleocapsídica do vírus Sendai tem sido clonado em vetores de expressão de *S. cerevisiae* pFGG3 sobre controle do promotor *GAL7*. Este sistema produz uma grande quantidade de proteínas nucleocapsídicas do vírus recombinante Sendai, o qual permite um aumento da produção de reagentes para sorologia e facilita a investigação da replicação viral e encapsulamento [91].

Deve ser observado que um limitado número de compostos derivados virais estão atualmente no mercado, e efetivas vacinas ou terapias ainda não se encontram disponíveis para a grande parte dos patógenos aqui discutidos.

### **Sistemas virais de *Saccharomyces cerevisiae* no desenvolvimento de vacinas**

Sistemas de expressão viral podem ser classificados em três tipos baseados nos componentes regulatórios e/ou estruturais que direcionam a expressão proteica: vetores plasmideais contendo elementos promotores, de vírus de eucariotos ou procariotos, vetores de infecção viral nos quais o gene de interesse é integrado no genoma viral e expresso por meio de um promotor viral num hospedeiro apropriado, e VLPs que representam subunidades estruturais compostas de múltiplas cópias de um capsídeo viral e/ou proteína de envelope capaz de auto-montagem em VLPs de definida simetria esférica *in vivo* [92-94].

Atualmente, VLPs compostos de uma proteína estrutural, geralmente são utilizados como antígenos particulados no desenho de vacinas protótipas, por possuírem inúmeras vantagens sobre as proteínas monoméricas imunógenas convencionais [95]. VLPs consistem de uma ou mais proteínas de empacotamento viral, as quais se montam

em partículas que podem ser reconhecidos por células apresentadoras de antígenos. Estas partículas podem ser apresentadas por moléculas MHC de classe 1 na superfície celular, assim obtendo uma resposta imune envolvendo células T CD8 + [96]. Um exemplo do uso de VLP no desenho de vacinas é o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) que tem sido sintetizado em *S. cerevisiae* utilizando um vetor de expressão que emprega a região flanqueadora 5' da álcool desidrogenase 1 de levedura como promotora para dirigir a transcrição da sequência codificadora do antígeno de superfície [92].

*S. cerevisiae* apresenta vantagens únicas como um sistema para desenvolver vacinas. Proteínas derivadas de leveduras, em sua forma solúvel ou como parte de uma vacina de levedura, são administradas, processadas, e apresentadas pelas células dendríticas usando moléculas de HLA classe 1 [97]. A resposta imune celular contra leveduras tem sido analisada por meio de citocinas intracelulares seguida de estimulação *ex vivo* de sangue total. Enquanto a resposta T-CD4 era marginal, extensiva resposta MHC de classe 1 restrita a células T- CD8+ foi detectada contra um número de espécies de levedura, incluindo linhagens ambientais e linhagens patogênicas ambientais. A indução de citocinas nas células T foi mais pronunciada em células intactas de levedura do que em esferoplastos, demonstrando que os dominantes imunogênicos estão localizados na parede da levedura. Assim, leveduras recombinantes apresentam-se como promissoras candidatas capazes de induzir uma eficiente resposta antigênica-específica das células T CD8+ [98]. Algumas leveduras, especialmente *S. cerevisiae* e *Pichia pastoris*, têm sido utilizadas com sucesso para expressar antígenos (Tabela 1). As vantagens do uso de VLPs incluem a sua estrutura particular e alto peso molecular, a sua produção em grande quantidade num hospedeiro heterólogo [58]. No

entanto, a *N*-acetilação de Gag, que é catalisada por Mak3p da célula hospedeira, é essencial para a formação dos VLPs *in vivo* [99].

Ainda assim, a lista de vantagens do uso de leveduras é longa e também inclui efeitos adjuvantes. A indução ótima das células mediadoras de imunidade requer a apresentação dos antígenos a células especializadas do sistema imune denominadas de células dendríticas (DCs). As células dendríticas são únicas na sua habilidade para processar antígenos exógenos via MHC de classe I, assim como na sua habilidade de ativar naturais, antígeno-específicas CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. As leveduras exibem um pronunciado efeito adjuvante, aumentando a apresentação às DC de proteínas exógenas antigênicas restritas às células T. Assim, leveduras recombinantes representam uma nova estratégia de indução de uma ampla base de respostas celulares imunes [100].

Defeitos no número e função das DCs têm sido observados durante a infecção por HIV-1, assim, uma vacina terapêutica para HIV-1 que seja direcionada às DCs ou às ative, provavelmente incrementa a imunogenicidade das vacinas [101]. Estudos ainda mais recentes têm indicado que proteínas fagocitadas também podem ser apresentadas pelas moléculas MHC de classe I, assim promovendo a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> [102]. Outra forma alternativa de apresentação de antígeno (também conhecida como apresentação cruzada) tem sido observada em células fagocíticas após o envolvimento das células bacterianas ou partículas virais [103-105].

As vantagens gerais dos sistemas de expressão de leveduras fazem das proteínas recombinantes candidatas promissoras na síntese de vacinas contra a infecção por hantavirus. Hantavírus são vírus de roedores que causam doenças severas em humanos. As sequências codificadoras para as proteínas nucleocapsídeas de *Puumala hantavirus* (PUUV) têm sido expressas em *S. cerevisiae* [106].

Estas vantagens não incluem somente a terapia por meio de vacinas. Na imunoterapia do câncer, a ativação das mutações nas oncoproteínas Ras representa um atrativo marcador, mas poucos vetores tem sido capazes de gerar repostas imunes necessárias à morte do tumor sem introduzir um vetor de neutralização. Em combinação com o sequenciamento genômico do tumor nos pacientes, a abordagem imunoterapêutica utilizando leveduras pode ser aplicada no tratamento de mutações nas oncoproteínas Ras [107].

As abordagens da terapia gênica têm dado preferência para métodos não virais de transferência gênica por inúmeras razões, particularmente pela sua segurança, simplicidade e conveniência na introdução de DNA heterólogo nas células. VLPs de poliomavírus VLPs representam um promissor transportador para ácidos nucléicos heterólogos encapsulados na terapia gênica. Para o desenvolvimento deste sistema de entrega gênica bem como para prover reagentes para diagnósticos que detectem infecções virais, um efetivo sistema de expressão de levedura para a geração de VLPs de poliomavírus tem sido estabelecido [58]. VLPs derivados de leveduras são geralmente livres de toxinas, DNA da célula hospedeira e proteínas. Estes VLPs podem ser utilizados na geração de novas ferramentas de diagnóstico, vacinas anti-virais, e sistemas de entrega gênica [108].

### **Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando sistemas virais**

Em sistemas eucarióticos, a introdução direta de moléculas de RNA em sistemas eucariotos apresenta vantagens sobre métodos de transfecção de DNA para o estudo de certas funções biológicas. Por exemplo, a expressão de RNA transiente permite inúmeros eventos nucleares incluindo a transcrição, *splicing* do RNA, e o transporte do RNA ao citoplasma [109]. Inúmeros tipos de moléculas de RNA têm sido introduzidos

com sucesso em células de mamíferos: moléculas virais infecciosas de RNA, derivados virais, moléculas de RNA não-replicativas e não viral, não replicativas moléculas de RNA [110,111].

Os métodos para introduzir ácidos nucleicos nas células incluem o uso de DNA ou RNA exógeno funcional, o qual proporciona vantagens na levedura, a expressão transiente de RNA suporta melhor uma variedade de eventos nucleares, incluindo transcrição e transporte de RNA no citoplasma [109]. Em adição, moléculas de mRNA funcional encapadas e desencapadas podem ser expressas em células de leveduras [112].

### **Secreção de proteínas heterólogas em *Saccharomyces cerevisiae* utilizando sequências virais**

Secreção de proteínas heterólogas expressas no meio extracelular é difícil em qualquer célula, principalmente devido a translocação pós-traducional no lúmen do retículo endoplasmático é seguido por subsequente triagem na rede Golgi [113,114]. Usualmente, a importação de proteínas heterólogas no ER é ativada pela fusão da proteína de interesse *in frame* com a sequência homóloga de secreção derivada de um sinal de secreção de proteína natural do correspondente hospedeiro. Os sinais mais comuns utilizados em leveduras são derivados de invertase, inulase,  $\alpha$ -galactosidase, fosfatase ácida, feromônio  $\alpha$ -fator, ou derivados da toxina *killer* de *Kluyveromyces lactis* [113,115].

Direcionar a secreção de uma proteína heteróloga é um passo importante que antecede a subsequente purificação. Leveduras secretam apenas baixas quantidades de proteínas endógenas, assim, a secreção de uma proteína recombinante participa com uma significativa porção do total de proteínas no meio externo.



A existência de homólogos de Kex2p/Kex1p, o qual é requerido para o processamento e maturação dos precursores proteicos *in vivo* pode ser encontrado em *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, e *Schizosaccharomyces pombe* [116-118]. A sequência viral ptox K28 apresenta-se como uma promissora ferramenta na secreção de proteínas recombinantes [118].

## **Conclusão**

O uso de *S. cerevisiae* como organismo modelo para produção de proteínas heterólogas utilizando seu sistema viral está se tornando uma importante ferramenta no desenvolvimento de sistemas de expressão heterólogos. A produção de proteínas heterólogas bem como de outras macromoléculas de origem viral utilizando fatores associados ao hospedeiro ou mesmo os sistemas virais nativos da levedura tem sido atingida, com altos níveis de expressão sendo economicamente viáveis

Os sistemas de expressão viral de *S. cerevisiae* são eficientes na produção e purificação de proteínas partículas-associadas, o qual pode proporcionar rendimentos substanciais de proteínas funcionais com facilidade de purificação. Em adição, a facilidade de fermentação em meios de baixo custo torna os sistemas virais de leveduras e fatores associados ao hospedeiro atrativos para a produção de proteínas heterólogas e vacinas, bem como o estudo dos fatores necessários para a montagem de vírus de plantas e animais.

## **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Universidade de Caxias do Sul, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; 002/2005-

PROADE3), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

1. Wickner RB. **Killer yeasts.** *Curr Top Med Mycol.* 1985;1:286-312.
2. Polonelli L, Morace G. **Reevaluation of the yeast killer phenomenon.** *J. Clin. Microbiol.* 1986 **24**:866–869.
3. Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. **Yeast killer systems.** *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jul;**10**(3):369-400.
4. Srivastava R, Lal SK: **A yeast assay for high throughput screening of natural anti-viral agents.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 31;**301**(1):218-21.
5. Esteban R, Wickner RB: **Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis.** *Mol Cell Biol.* 1986 May;**6**(5):1552-61.
6. Ribas JC, Wickner RB: ***Saccharomyces cerevisiae* L-BC double-stranded RNA virus replicase recognizes the L-A positive-strand RNA 3' end.** *J Virol.* 1996 Jan;**70**(1):292-7.
7. Wickner RB. **Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol Rev.* 1996 Mar;**60**(1):250-65.
8. Dinman JD, Icho T, Wickner RB. **A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 1;**88**(1):174-8.
9. Tang J, Naitow H, Gardner NA, Kolesar A, Tang L, Wickner RB, Johnson JE. **The structural basis of recognition and removal of cellular mRNA 7-methyl G 'caps' by a viral capsid protein: a unique viral response to host defense.** *J Mol Recognit.* 2005 Mar-Apr;**18**(2):158-68.

10. Fujimura T, Wickner RB. **Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. In vitro conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form.** *J Biol Chem.* 1988 Jan 5;**263**(1):454-60.
11. Wickner RB, Fujimura T, Esteban R. **Overview of double-stranded RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Basic Life Sci.* 1986 **40**:149-63.
12. Fujimura T, Esteban R, Wickner RB. **In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;**83**(12):4433-7.
13. Cheng RH, Caston JR, Wang GJ, Gu F, Smith TJ, Baker TS, Bozarth RF, Trus BL, Cheng N, Wickner RB, *et al.* **Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers.** *J Mol Biol.* 1994 Dec 2;**244**(3):255-8.
14. Dinman JD, Wickner RB. **Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation.** *J Virol.* 1992 Jun;**66**(6):3669-76.
15. Caspar DL, Klug.A. **Physical principles in the construction of regular viruses.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1962 **27**:1–24.
16. Caston JR, Trus BL, Booy FP, Wickner RB, Wall JS, Steven AC. **Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA.** *J. Cell Biol.* 1997 **138**: 975-985.
17. Sommer SS, Wickner RB: **Gene disruption indicates that the only essential function of the SKI8 chromosomal gene is to protect *Saccharomyces cerevisiae* from viral cytopathology.** *Virology.* 1987 Mar;**157**(1):252-6.

18. El-Sherbeini M, Tipper DJ, Mitchell DJ, Bostian KA: **Virus-like particle capsid proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: their roles in maintenance of M double-stranded killer plasmids.** *Mol Cell Biol.* 1984 Dec;**4**(12):2818-27.
19. Newman AM, Elliot SG, McLaughlin CS, Sutherland PA, Warner RC. **Replication of double-stranded RNA of the virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Virol.* 1981 **38**:263–271.
20. Naitow H, Tang J, Canady M, Wickner RB, Johnson JE: **L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism.** *Nat Struct Biol.* 2002 Oct;**9**(10):725-8.
21. Icho T, Wickner RB: **The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames.** *JBiol Chem.* 1989 Apr 25;**264**(12):6716-23.
22. Ribas JC, Wickner RB: **The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem.* 1998 Apr 10;**273**(15):9306-11.
23. Fujimura T, Ribas JC, Makhov AM, Wickner RB: **Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus.** *Nature.* 1992 Oct 22;**359**(6397):746-9.
24. Ribas JC, Fujimura T, Wickner RB: **Essential RNA binding and packaging domains of the Gag-Pol fusion protein of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;**269**(45):28420-8.
25. Palfree R, Bussey H. **Yeast killer toxin: purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eur. J. Biochem.* 1979 **93**:487-493.

26. Dignard D, Whiteway M, Germain D, Tessier D, Thomas DY. **Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene.** *Mol Gen Genet.* 1991 May;**227**(1):127-36.
27. Ghabrial SA. **New developments in fungal virology.** *Adv Virus Res.* 1994;**43**:303-88.
28. Huan BF, Shen YQ, Bruenn JA. **In vivo mapping of a sequence required for interference with the yeast killer virus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991 **88**: 1271-1275.
29. Lee M, Pietras DF, Nemeroff ME, Corstanje BJ, Field LJ, Bruenn JA. **Conserved regions in defective interfering viral double-stranded RNAs from a yeast virus.** *J Virol.* 1986 May;**58**(2):402-7.
30. Ribas JC, Wickner RB. **RNA-dependent RNA polymerase consensus sequence of the L-A double-stranded RNA virus: definition of essential domains.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992 **89**: 2185-2189.
31. Esteban R, Wickner RB. **A deletion mutant of L-A double-stranded RNA replicates like M1 double-stranded RNA.** *J Virol.* 1988 Apr;**62**(4):1278-85.
32. Esteban R, Fujimura T, Wickner RB. **Site-specific binding of viral plus single-stranded RNA to replicase-containing open virus-like particles of yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun;**85**(12):4411-5.
33. Widner WR, Matsumoto Y, Wickner RB: **Is 20S RNA naked?** *Mol Cell Biol.* 1991 May;**11**(5):2905-8.
34. Esteban R, Vega L, Fujimura T: **Launching of the yeast 20 s RNA narnavirus by expressing the genomic or antigenomic viral RNA in vivo.** *J Biol Chem.* 2005 Oct 7;**280**(40):33725-34. Epub 2005 Jul 27.

35. Rodriguez-Cousiño N, Esteban R: **Both yeast W double-stranded RNA and its single-stranded form 20S RNA are linear.** *Nucleic Acids Res.* 1992 Jun 11;**20**(11):2761-6.
36. Esteban LM, Rodriguez-Cousiño N, Esteban R. **T double-stranded RNA (dsRNA) sequence reveals that T and W dsRNAs form a new RNA family in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of 23 S RNA as the single-stranded form of T dsRNA.** *J Biol Chem.* 1992 May 25;**267**(15):10874-81.
37. Fujimura T, Esteban R: **The bipartite 3'-cis-acting signal for replication is required for formation of a ribonucleoprotein complex in vivo between the viral genome and its RNA polymerase in yeast 23 S RNA virus.** *J Biol Chem.* 2004 Oct 15;**279**(42):44219-28.
38. Matsumoto Y, Fishel R, Wickner RB. **Circular single-strandedRNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990 Oct;**87**(19):7628-32.
39. Matsumoto Y, Sarkar G, Sommer SS, Wickner RB. **A yeast antiviral protein, SKI8, shares a repeated amino acid sequence pattern with beta-subunits of G proteins and several other proteins.** *Yeast.* 1993 Jan;**9**(1):43-51.
40. Rhee SK, Icho T, Wickner RB. **Structure and nuclear localization signal of the SKI3 antiviral protein of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast.* 1989 May-Jun;**5**(3):149-58.
41. Tercero JC, Dinman JD, Wickner RB. **Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus.** *J Bacteriol.* 1993 May;**175**(10):3192-4.
42. Lee Y, Wickner RB. **MAK10, a glucose-repressible gene necessary for replication of a dsRNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*, has Tcell receptor  $\alpha$ -subunit motifs.** *Genetics.* 1992 Sep;**132**(1):87-96.

43. Fujimura T, Wickner RB. **L-A double-stranded RNA virus-like particle replication cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: particle maturation in vitro and effects of mak10 and pet18 mutations.** *Mol. Cell. Biol.* 1987 Jan;**7**(1):420-6.
44. Wickner RB, Toh-e A. **[HOK], a new yeast non-Mendelian trait, enables a replication-defective killer plasmid to be maintained.***Genetics.* 1982 Feb;**100**(2):159-74.
45. Wickner W. **Assembly of proteins into membranes.** *Science.* 1980 Nov 21;**210**(4472):861-8.
46. Wickner RB, Ridley SP, Fried HM, Ball SG. **Ribosomal protein L3 is involved in replication or maintenance of the killer double-stranded RNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Aug;**79**(15):4706-8.
47. Tipper DJ, Bostian KA. **Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts.** *Microbiol Rev.* 1984 Jun;**48**(2):125-56.
48. Schmitt MJ, Tipper DJ. **Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28.** *Yeast.* 1992 May;**8**(5):373-84.
49. Bevan EA, Makower M. **The physiological basis of the “killer”- character in yeast.** *Proc. Int. Congr. Genet.* 1963 11203.
50. Novick P, Field C, Schekman R. **Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway.** *Cell.* 1980 Aug;**21**(1):205-15.
51. Goto K, Fukuda H, Kichise K, Kitano K, Hara S. **Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Agric Biol Chem.* 1991 Aug;**55**(8):1953-8.
52. Tipper DJ, Schmitt MJ. **Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes.** *Mol. Microbiol.* 1991 **5**: 2331-2338.



53. Schmitt MJ, Breinig F: **The viral killer system in yeast: from molecular biology to application.** *FEMS Microbiol Rev.* 2002 Aug;**26**(3):257-76.
54. Fujimura T, Esteban R: **Recognition of RNA encapsidation signal by the yeast L-A double-stranded RNA virus.** *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;**275**(47):37118-26.
55. Provost F, Polonelli L, Conti S, Fiscicaro P, Gerloni M, Boiron P: **Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex.** *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;**33**(1):8-10.
56. Morace G, Manzara S, Dettori G, Fanti F, Conti S, Campani L, Polonelli L, Chezzi C: **Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system.** *Eur J Epidemiol.* 1989 Sep;**5**(3):303-10.
57. Schmitt MJ, Reiter J: **Viral induced yeast apoptosis.** *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul;**1783**(7):1413-7.
58. Powilleit F, Breinig T, Schmitt MJ: **Exploiting the yeast L-A viral capsid for the *in vivo* assembly of chimeric VLPs as platform in vaccine development and foreign protein expression.** *PLoS ONE.* 2007 May 2;**2**(5):e415.
59. Piganeau N, Schauer UE, Schroeder R: **A yeast RNA-hybrid system for the detection of RNA-RNA interactions *in vivo*.** *RNA.* 2006 Jan;**12**(1):177-84.
60. Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R: **The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 18;**236**(2):360-4.
61. Isoyama T, Kuge S, Nomoto A: **The core protein of hepatitis C virus is imported into the nucleus by transport receptor Kap123p but inhibits Kap121p-dependent nuclear import of yeast AP1-like transcription factor in yeast cells.** *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;**277**(42):39634-41.

62. Brass V, Bieck E, Montserret R, Wölk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D: **An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A.** *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;**277**(10):8130-9.
63. Janda M, Ahlquist P: **RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*.** *Cell.* 1993 Mar 26;**72**(6):961-70.
64. Rubino L, Di Franco A, Russo M. **Expression of a plant virus non-structural protein in *Saccharomyces cerevisiae* causes membrane proliferation and altered mitochondrial morphology.** *J Gen Virol.* 2000 Jan;**81**(Pt 1):279-86.
65. Pogany J, Nagy PD., **Authentic replication and recombination of Tomato bushy stunt virus RNA in a cell-free extract from yeast.** *J Virol.* 2008 Jun;**82**(12):5967-80.
66. Rubino L, Navarro B, Russo M. **Cymbidium ringspot virus defective interfering RNA replication in yeast cells occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes in the absence of peroxisomes.** *J Gen Virol.* 2007 May;**88**(Pt 5):1634-42.
67. Price BD, Roeder M, Ahlquist P. **DNA-Directed expression of functional flock house virus RNA1 derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, heterologous gene expression, and selective effects on subgenomic mRNA synthesis.** *J Virol.* 2000 Dec;**74**(24):11724-33.
68. Albariño CG, Price BD, Eckerle LD, Ball LA. **Characterization and template properties of RNA dimers generated during flock house virus RNA replication.** *Virology.* 2001 Oct 25;**289**(2):269-82.
69. Kim K, Angeletti PC, Hassebroek EC, Lambert PF. **Identification of cis-acting elements that mediate the replication and maintenance of human papillomavirus type 16 genomes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Virol.* 2005 May;**79**(10):5933-42.

70. Zhao KN, Frazer IH. **Replication of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) DNA in *Saccharomyces cerevisiae* following infection with BPV-1 virions.** *J Virol.* 2002 Apr;**76**(7):3359-64.
71. Singh DK, Islam MN, Choudhury NR, Karjee S, Mukherjee SK. **The 32 kDa subunit of replication protein A (RPA) participates in the DNA replication of Mung bean yellow mosaic India virus (MYMIV) by interacting with the viral Rep protein.** *Nucleic Acids Res.* 2007;**35**(3):755-70.
72. Panavas T, Nagy PD: **Yeast as a model host to study replication and recombination of defective interfering RNA of Tomato bushy stunt virus.** *Virology.* 2003 Sep 15;**314**(1):315-25.
73. Pantaleo V, Rubino L, Russo M: **Replication of Carnation Italian ringspot virus defective interfering RNA in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Virol.* 2003 Feb;**77**(3):2116-23.
74. Raghavan V, Malik PS, Choudhury NR, Mukherjee SK: **The DNA-A component of a plant geminivirus (Indian mung bean yellow mosaic virus) replicates in budding yeast cells.** *J Virol.* 2004 Mar;**78**(5):2405-13.
75. Frischmuth S, Kleinow T, Aberle HJ, Wege C, Hülser D, Jeske H: **Yeast two-hybrid systems confirm the membrane- association and oligomerization of BC1 but do not detect an interaction of the movement proteins BC1 and BV1 of Abutilon mosaic geminivirus.** *Arch Virol.* 2004 Dec;**149**(12):2349-64.
76. Rudinger J, Felden B, Florentz C, Giegé R: **Strategy for RNA recognition by yeast histidyl-tRNA synthetase.** *Bioorg Med Chem.* 1997 Jun;**5**(6):1001-9.
77. Alves-Rodrigues I, Galão RP, Meyerhans A, Díez J: ***Saccharomyces cerevisiae*: a useful model host to study fundamental biology of viral replication.** *Virus Res.* 2006 Sep;**120**(1-2):49-56.

78. Price BD, Rueckert RR, Ahlquist P: **Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;**93**(18):9465-70.
79. Price BD, Ahlquist P, Ball LA: **DNA-directed expression of an animal virus RNA for replication-dependent colony formation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Virol.* 2002 Feb;**76**(4):1610-6.
80. Price BD, Eckerle LD, Ball LA, Johnson KL: **Nodamura virus RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*: heterologous gene expression allows replication-dependent colony formation.** *J Virol.* 2005 Jan;**79**(1):495-502.
81. Weeks SA, Miller DJ: **The heat shock protein 70 cochaperone YDJ1 is required for efficient membrane-specific flock house virus RNA replication complex assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Virol.* 2008 Feb;**82**(4):2004-12.
82. Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A, Nagata K: **An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 13;**104**(46):18235-40.
83. DeMarini DJ, Johnston VK, Konduri M, Gutshall LL, Sarisky RT: **Intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity.** *J Virol Methods.* 2003 Oct;**113**(1):65-8.
84. Angeletti PC, Kim K, Fernandes FJ, Lambert PF: **Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Virol.* 2002 Apr;**76**(7):3350-8.
85. Zhao KN, Frazer IH: ***Saccharomyces cerevisiae* is permissive for replication of bovine papillomavirus type 1.** *J Virol.* 2002 Dec;**76**(23):12265-73.

86. Rossi JL, Gissmann L, Jansen K, Müller M: **Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Hum Gene Ther.* 2000 May 20;**11**(8):1165-76.
87. Parissi V, Caumont AB, de Soultrait VR, Calmels C, Pichuanes S, Litvak S, Dupont CH: **Selection of amino acid substitutions restoring activity of HIV-1 integrase mutated in its catalytic site using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Mol Biol.* 2000 Jan 28;**295**(4):755-65.
88. Saha N, Shuman S, Schwer B: **Yeast-based genetic system for functional analysis of poxvirus mRNA cap methyltransferase.** *J Virol.* 2003 Jul;**77**(13):7300-7.
89. Afifi R, Sharf R, Shtrichman R, Kleinberger T: **Selection of apoptosis-deficient adenovirus E4orf4 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Virol.* 2001 May;**75**(9):4444-7.
90. Hawkins CJ, Silke J, Verhagen AM, Foster R, Ekert PG, Ashley DM: **Analysis of candidate antagonists of IAP-mediated caspase inhibition using yeast reconstituted with the mammalian Apaf-1-activated apoptosis mechanism.** *Apoptosis.* 2001 Oct;**6**(5):331-8.
91. Juozapaitis M, Slibinskas R, Staniulis J, Sakaguchi T, Sasnauskas K: **Generation of Sendai virus nucleocapsid-like particles in yeast.** *Virus Res.* 2005 Mar;**108**(1-2):221-4.
92. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD: **Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast.** *Nature.* 1982 Jul 22;**298**(5872):347-50.
93. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT: **Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;**89**(24):12180-4.

94. Kost TA, Condreay JP: **Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells.** *Curr Opin Biotechnol.* 1999 Oct;**10**(5):428-33.
95. Krüger DH, Ulrich R, Gerlich WH: **Chimeric virus-like particles as vaccines.** *Biol Chem.* 1999 Mar;**380**(3):275-6.
96. Gilbert SC: **Virus-like particles as vaccine adjuvants.** *Mol Biotechnol.* 2001 Oct;**19**(2):169-77.
97. Wadle A, Held G, Neumann F, Kleber S, Wuellner B, Asemissen AM, Kubuschok B, Scheibenbogen C, Breinig T, Meyerhans A, Renner C: **Cross-presentation of HLA class I epitopes from influenza matrix protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Vaccine.* 2006 Sep 11;**24**(37-39):6272-81.
98. Heintel T, Breinig F, Schmitt MJ, Meyerhans A: **Extensive MHC class I-restricted CD8 T lymphocyte responses against various yeast genera in humans.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Dec 5;**39**(3):279-86.
99. Tercero JC, Wickner RB: **MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the L-A gag NH2 terminus is necessary for virus particle assembly.** *J Biol Chem.* 1992 Oct 5;**267**(28):20277-81.
100. Stubbs AC, Martin KS, Coeshott C, Skaates SV, Kuritzkes DR, Bellgrau D, Franzusoff A, Duke RC, Wilson CC: **Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity.** *Nat Med.* 2001 May;**7**(5):625-9.
101. Barron MA, Blyveis N, Pan SC, Wilson CC: **Human dendritic cell interactions with whole recombinant yeast: implications for HIV-1 vaccine development.** *J Clin Immunol.* 2006 May;**26**(3):251-64. Epub 2006 May 13.
102. Ackerman AL, Cresswell P: **Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens.** *Nat Immunol.* 2004 Jul;**5**(7):678-84.

103. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL: **A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules.** *Science*. 1995 Jan 13;**267**(5195):243-6.
104. Morón VG, Rueda P, Sedlik C, Leclerc C: ***In vivo*, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway.** *J Immunol*. 2003 Sep 1;**171**(5):2242-50.
105. Tsunetsugu-Yokota Y, Morikawa Y, Isogai M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Nakamura T, Grassi F, Autran B, Iwamoto A: **Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs.** *J Virol*. 2003 Oct;**77**(19):10250-9.
106. Dargeviciute A, Brus Sjölander K, Sasnauskas K, Krüger DH, Meisel H, Ulrich R, Lundkvist A: **Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model.** *Vaccine*. 2002 Oct 4;**20**(29-30):3523-31.
107. Lu Y, Bellgrau D, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, Duke RC, Rodell TC, Franzusoff A: **Mutation-selective tumor remission with Ras-targeted, whole yeast-based immunotherapy.** *Cancer Res*. 2004 Aug 1;**64**(15):5084-8.
108. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, Dargeviciute A, Bartkeviciute D, Zvirbliene A, Staniulis J, Brown DW, Ulrich R: **Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Intervirology*. 2002;**45**(4-6):308-17.
109. Klump WM, Bergmann I, Müller BC, Ameis D, Kandolf R. **Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis** *J Virol*. 1990 Apr;**64**(4):1573-83.

110. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. **Cationic liposome-mediated RNA transfection.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;**86**(16):6077-81.
111. Kleinschmidt AM, Pederson T. **RNA processing and ribonucleoprotein assembly studied in vivo by RNA transfection.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;**87**(4):1283-7.
112. Russell PJ, Hambidge SJ, Kirkegaard K. **Direct introduction and transient expression of capped and non-capped RNA in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nucleic Acids Res.* 1991 Sep 25;**19**(18):4949-53.
113. Sambamurti, K. **Expression and secretion of mammalian proteins in *Schizosaccharomyces pombe*,** pp. 149–158. In Y. Giga-Hama and H. Kumagai(ed.), *Foreign gene expression in fission yeast: *Schizosaccharomyces pombe**. Springer, New York, N.Y.1997.
114. Kjeldsen T, Hach M, Balschmidt P, Havelund S, Pettersson AF, Markusson J. **Prepro-leaders lacking N-linked glycosylation for secretory expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Protein Expr. Purif.*1998 ;**14**:309–316.
- 115 Chung, B H, Nam SW, Kim BM, Park YH **Highly efficient secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal peptides.** *Biotechnol. Bioeng.* 1996;**49**:473–479.
116. Bader O, Schaller M, Klein S, Kukula J, Haack K, Mühlshlegel F, Korting HC, Schäfer W, Hube B. **The KEX2 gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity.** *Mol Microbiol.* 2001 Sep;**41**(6):1431-44.
117. Boehm T, Pirie-Shepherd S, Trinh LB, Shiloach J, Folkman J. **Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin.** *Yeast.* 1999 May;**15**(7):563-72.



118. Eiden-Plach A, Zagorc T, Heintel T, Carius Y, Breinig F, Schmitt MJ. **Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*.** *Appl Environ Microbiol.* 2004 Feb;**70**(2):961-6.
119. Wansley EK, Chakraborty M, Hance KW, Bernstein MB, Boehm AL, Guo Z, Quick D, Franzusoff A, Greiner JW, Schlom J, Hodge JW. **Vaccination with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses.** *Clin Cancer Res.* 2008 Jul 1;**14**(13):4316-25.
120. Bernstein MB, Chakraborty M, Wansley EK, Guo Z, Franzusoff A, Mostböck S, Sabzevari H, Schlom J, Hodge JW. **Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells.** *Vaccine.* 2008 Jan 24;**26**(4):509-21.
121. Berner VK, Sura ME, Hunter KW Jr. **Conjugation of protein antigen to microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Oct;**80**(6):1053-61.
122. Petraityte R, Jin L, Hunjan R, Razanskiene A, Zvirbliene A, Sasnauskas K. **Use of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed recombinant nucleocapsid protein to detect Hantaan virus-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM in oral fluid.** *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Dec;**14**(12):1603-8.
123. Juozapaitis M, Zvirbliene A, Kucinskaite I, Sezaite I, Slibinskas R, Coiras M, de Ory Manchon F, López-Huertas MR, Pérez-Breña P, Staniulis J, Narkeviciute I, Sasnauskas K. **Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3**

**nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Virus Res.* 2008 May;**133**(2):178-86.

124. Lau YL, Fong MY. ***Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*.** *Exp Parasitol.* 2008 Jul;**119**(3):373-8.

125. Ottone S, Nguyen X, Bazin J, Bérard C, Jimenez S, Letourneur O. **Expression of hepatitis B surface antigen major subtypes in *Pichia pastoris* and purification for in vitro diagnosis** *Protein Expr Purif.* 2007 Dec;**56**(2):177-88.

126. Seo HS, Park JS, Han KY, Bae KD, Ahn SJ, Kang HA, Lee J. **Analysis and characterization of hepatitis B vaccine particles synthesized from *Hansenula polymorpha*.** *Vaccine.* 2008 Aug 5;**26**(33):4138-44.

**Tabela 1:** Desenvolvimento de vacinas utilizando leveduras

<b>Antígenos</b>	<b>Leveduras</b>	<b>Referências</b>
Antígeno humano carcino-embriônico (CEA)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[120,121]
Beta-glucano microparticulado (adjuvante para imunizações orais e intradérmicas)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[122]
Proteína de nucleocapsídeo recombinante para detectar imunoglobulinas G e M antavírus-específicas em fluidos orais	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[123]
Proteína recombinante humana de parainfluenza vírus 1 e proteína de nucleocapsídeo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[124]
Antígeno de Toxoplasma	<i>Pichia pastoris</i>	[125]
Antígeno da hepatite B	<i>Pichia pastoris e</i> <i>Hansenula polymorpha</i>	[126,127]

## Legendas das figuras

**Figura 1. Via de secreção das toxinas *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*.** Após a translação da sequência pré-pró-toxina (pptox) da fita (+) ssRNA (representado pela seta dobrada), a proteína é importada no lúmen do retículo endoplasmático (ER), onde a sequência pré é clivada por meio de uma peptidase específica (SP). A pró-toxina (ptox) então vai até o complexo de Golgi, onde a sequência pró e a região  $\gamma$  são removidas por Kexp peptidases e a toxina madura heterodimérica ( $\beta/\alpha$ ) é formada dirigindo-se posteriormente às vesículas secretórias. Símbolos: PM, membrana plasmática; CW, parede celular.

**Figura 2. Ciclo de replicação do vírus L-A e seu satélite ScV-M1.** Ambos os vírus competem pelas dsRNA proteínas virais Gag e Gag-Pol, as quais são codificadas por um (+) ssRNA transcrito do genoma do L-A. Estas duas proteínas são essenciais à estrutura da partícula viral para o empacotamento do (+) ssRNA viral; para a replicação do (+) ssRNA, o qual gera dsRNA; e para transcrição do dsRNA, o qual por sua vez gera novas cópias do (+) ssRNA.

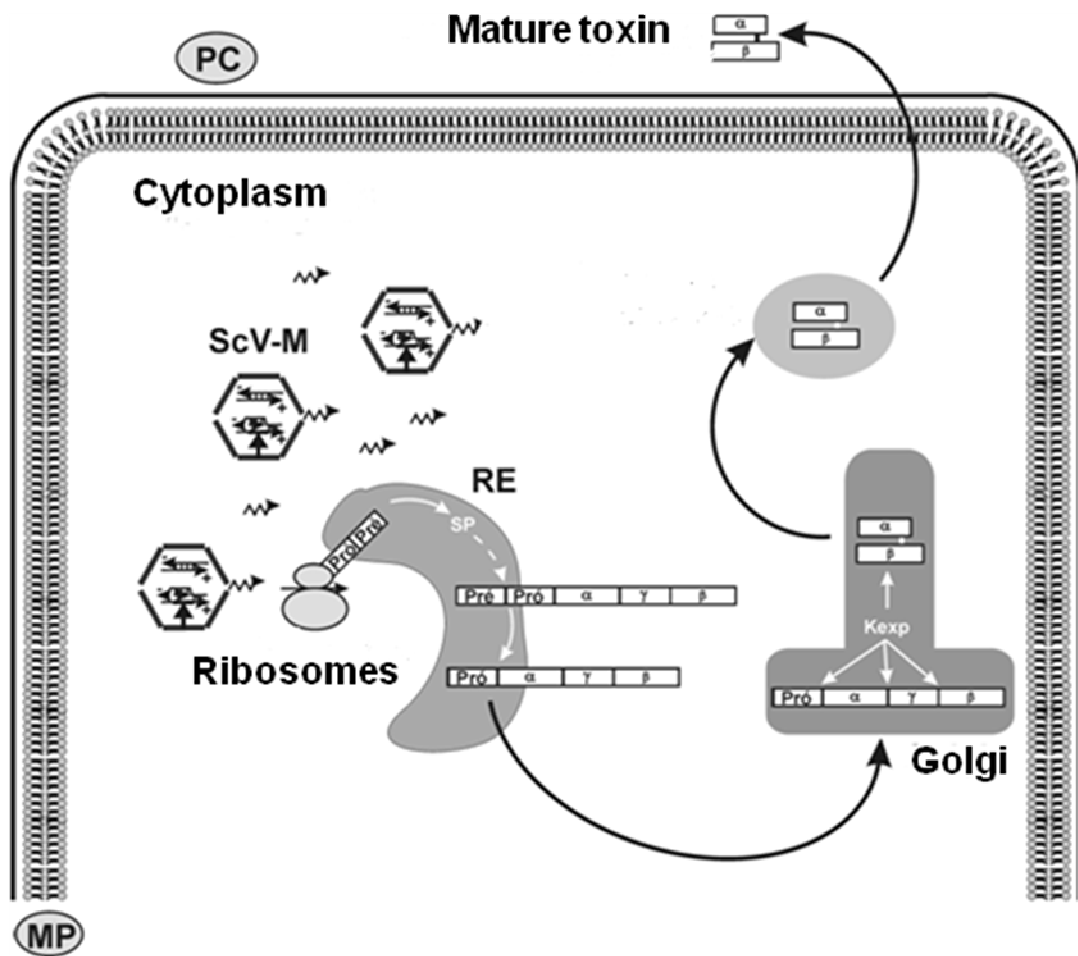


Figura 1. Via de secreção das toxinas *killer* em *Saccharomyces cerevisiae*

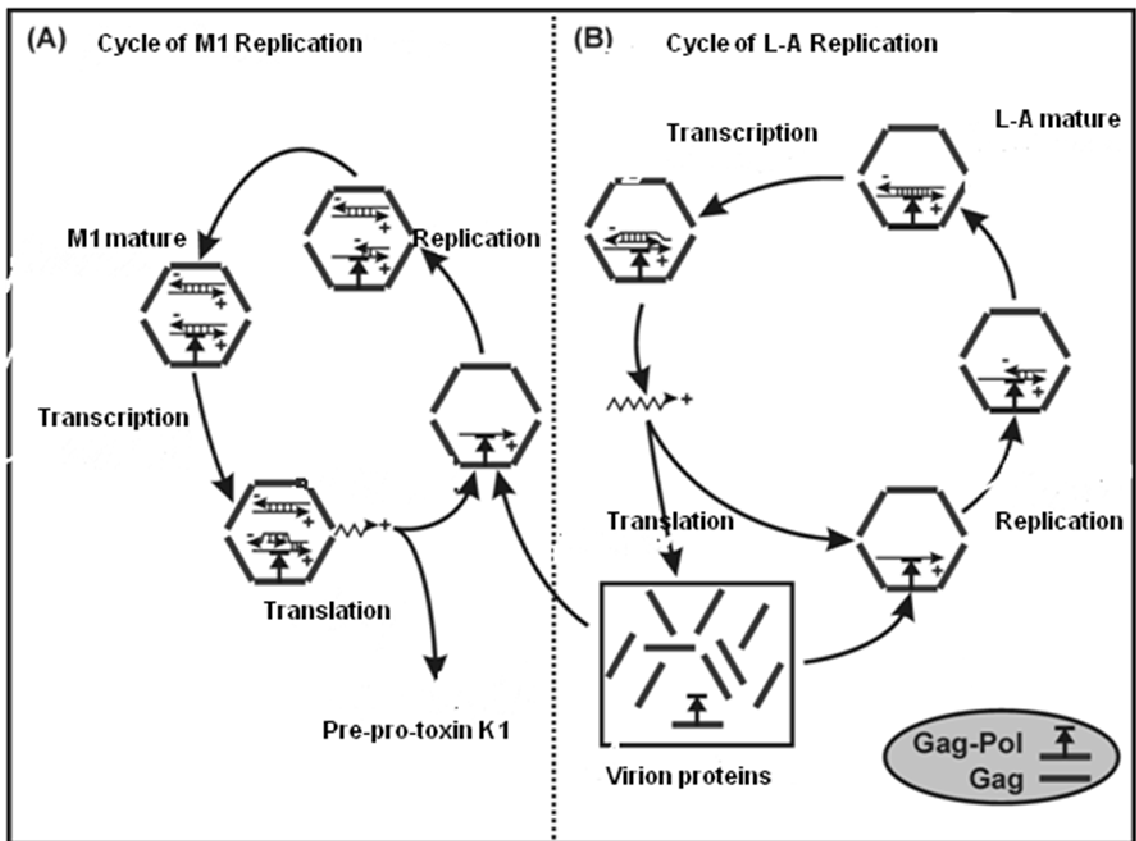


Figura 2. Ciclo de replicação do vírus L-A e seu satélite ScV-M1

## **Capítulo 2**

“Desenho e Construção Gênica Compreendendo Sistemas Virais, Célula Transformada, Método de Expressão de Peptídeos e/ou Proteínas Heterólogas Fusionadas ou não e Composição Compreendendo o Mesmo”

**Pedido de propriedade intelectual depositado**

**INPI 020080110888**

## Formulário do depósito



## Formulário do depósito

Formulário INPI

## **Adendo I**

### **Materiais e Métodos Complementares do Pedido de Patente Intitulado:**

“Desenho e Construção Gênica compreendendo Sistemas Virais, Célula Transformada, Método de Expressão de Peptídeos e/ou Proteínas Heterólogas Fusionadas ou não e Composição Compreendendo o Mesmo”

## 1.MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1. Meios de cultura, linhagens e plasmídeos

Para o cultivo das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foi utilizado o meio completo YEPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de bacto-peptona e 20 g/L de glicose). Para o meio sólido foram adicionados 20 g/L de bacto-ágar). O meio YAPD, utilizado para a estocagem das linhagens de leveduras, possui a mesma formulação do YEPD, sendo adicionado de 0,04 g/L de sulfato de adenina. O meio sintético SynCoS (182,2 g/L de sorbitol, 0,17 g/L de base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos e sulfato de amônia, 5 g/L de sulfato de amônia, 20 g/L de glicose e 20 mg/L de aminoácidos e bases nitrogenadas) foi utilizado para o cultivo dos esferoplastos de *S. cerevisiae* transformados com as construções gênicas.

Para o cultivo de *Escherichia coli*, foi utilizado o meio de Luria-Bertani ou LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl), suplementado com ampicilina a uma concentração final de 150 µg/L para a seleção dos transformantes.

As linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli*, bem como os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho, estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1. Linhagens e plasmídeos utilizados neste trabalho.**

<b>Linhagens e plasmídeos</b>	<b>Genótipos</b>
<i>S. cerevisiae</i>	
GG100-14D 28	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3-52 his3 trp1 pho3 pho5</i> L-A L-B M0 Selvagem, K28 <i>killer</i> , genótipo desconhecido L-A M28
<i>E. coli</i>	
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)]
TOP10	<i>F- mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 deoR recA1 araD139 <math>\Delta</math> (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>
Plasmídeos	
pZErO <sup>®</sup> -2	<i>kan<sup>R</sup>, ccdB</i>
pScVURAM-I	Derivado do pZErO <sup>®</sup> -2. Contém a fusão ScVURAM-I
pScVURAM-E	Derivado do pZErO <sup>®</sup> -2. Contém a fusão ScVURAM-E
PM1Pst-4	Derivado do pBluescript <sup>®</sup> SK+ ( <i>amp<sup>R</sup></i> ). Contém a seqüência completa do ScV-M1

## 1.2. Reagentes e materiais de consumo para biologia molecular e microbiologia

Todos os reagentes bem como os materiais de consumo para os ensaios de biologia molecular, para o cultivo e a manutenção dos microrganismos foram adquiridos da SERVA Electrophoresis GmbH (Heildeberg, Alemanha), da Bio-Rad

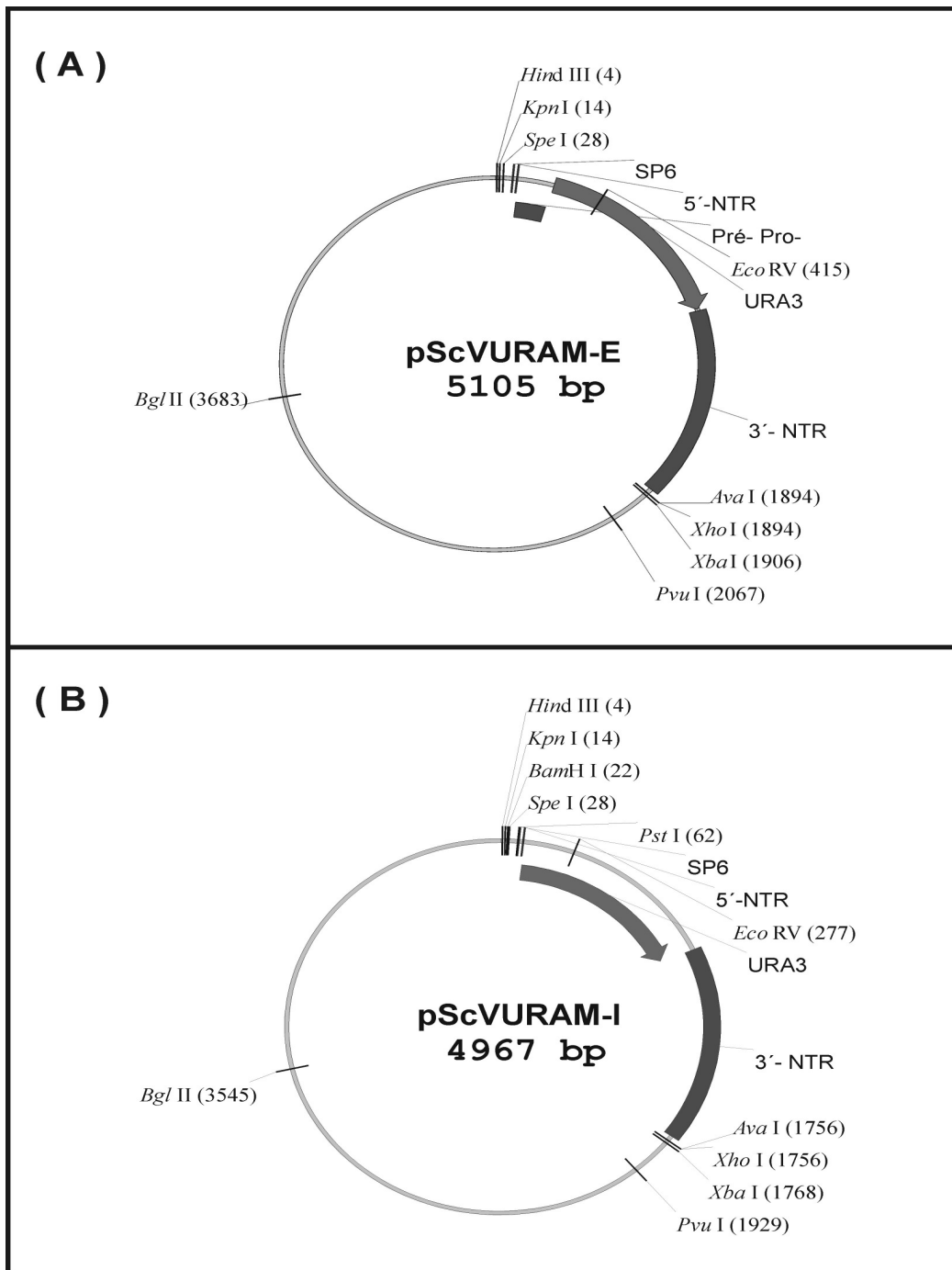
Laboratories, Inc., (Hercules, CA – USA), da Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA - USA), da Stratagene Co. (Cedar Creek, TX – USA), da Ambion Inc. (Austin, TX - USA), da Difco Labs. (Detroit, MI - USA), da Millipore Corp. (Billerica, MA – USA) e da Sigma Co. (St. Louis, MO - USA).

### **1.3. Procedimentos de Biologia Molecular**

Os procedimentos básicos para a manipulação de ácidos nucleicos (digestão com enzimas de restrição, análise e isolamento de fragmentos de DNA em géis de agarose, formulação de tampões, entre outros foram realizados de acordo com Ausubel *et al.* (1987).

### **1.4. Construção dos Sistemas de Expressão Viral Heterólogos**

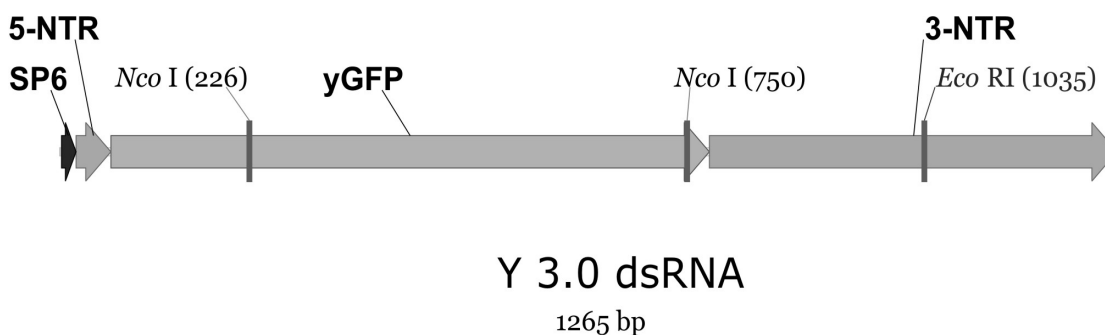
As construções das fusões ScVURAM, sejam estas para a secreção de proteínas (ScVURAM-E), ou produção intracelular (ScVURAM-I) encontram-se ilustradas na figura 01 A e B.



**Figura 01.** Plasmídeos pScVURAM-E (A) e pScVURAM-I (B). Abreviações: SP6 (promotor do bacteriófago SP6), 5'-NTR (região 5' não traduzida) e 3'-NTR (região 3' não traduzida).

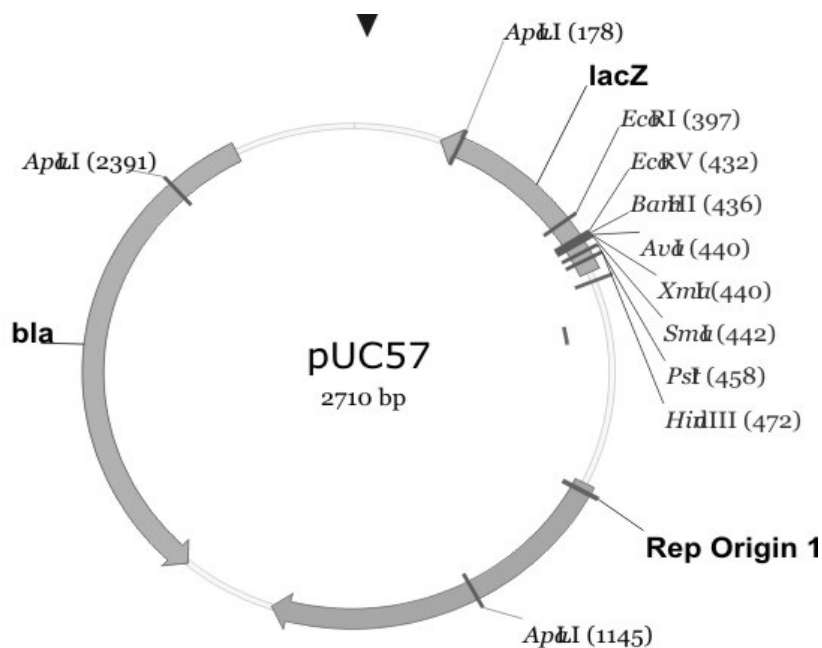
### 1.5. Desenho e montagem de sistemas sintéticos de expressão viral em *S. cerevisiae*

Com a disponibilidade cada vez maior de processos de síntese *in vitro* de genes e outras moléculas de DNA de grande tamanho (acima de 500pb) para a comunidade científica e considerando a limitação de tempo para a execução de projetos, o nosso grupo de pesquisas optou pela construção de um sistema sintético de expressão de RNA em *S. cerevisiae* utilizando, para tanto, uma seqüência viral comumente presente em leveduras denominada de “X”, a qual foi fusionada o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* ou GFP). Esse sistema, denominado de “Y3.0”, foi colocado sob o controle do promotor SP6, o qual é reconhecido e transcrito pela RNA polimerase dependente de RNA do bacteriófago SP6 (Figura 02). A construção Y3.0 está fusionada ao plasmídeo pUC57 de *E. coli* (Figura 03) e os plasmídeos resultantes foram denominados de pY3.0 (Figura 2). Todas as construções foram sintetizadas pela empresa Genscript Corporation (Piscataway, USA).



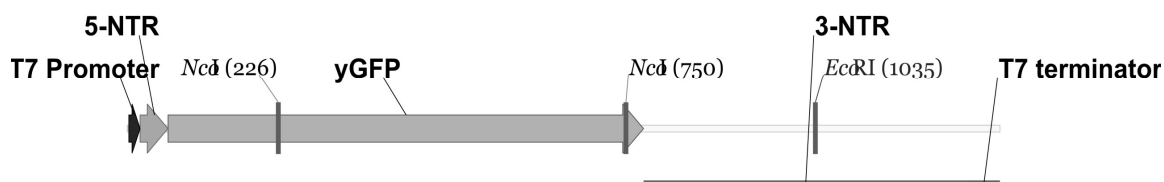
**Figura 02.** Sistema viral sintético Y3.0 derivado da fusão da partícula viral X (3'-NTR) de *S. cerevisiae* com o gene que codifica para a proteína fluorescente verde otimizada para expressão em leveduras (yGFP). O promotor SP6 (Y3.0) e a região 5'-NTR (obtida do sistema X e usada para a excreção de proteínas no meio extracelular), estão representadas na figura. A construção foi ligada ao vetor pUC57 (Figura 03) de *E. coli*, gerando o plasmídeo pY3.0.





**Figura 03.** A construção Y 3.0 (Figura 02) está ligada vetor pUC57 de *E. coli* gerando o plasmídeo pY3.0

Também foi realizado o desenho de uma segunda construção denominada de Y3.1 que apresenta como promotor o T7, no entanto esta construção ainda não foi testada pelo nosso grupo.



### Y 3.1 dsRNA

1313 bp

**Figura 04.** Sistema viral sintético Y3.1 derivado da fusão da partícula viral X (3'-NTR) de *S. cerevisiae* com o gene que codifica para a proteína fluorescente verde otimizada para expressão em leveduras (yGFP). O promotor T7 e a região 5'-NTR (obtida do sistema X e usada para a excreção de proteínas no meio extracelular), estão

representadas na figura. A construção seria ligada ao vetor pUC57 (Figura 03) de *E. coli*, gerando o plasmídeo pY3.1.

### **1.6. Transcrição *in vitro* do sistema viral Y3.0**

A transcrição *in vitro* do sistema viral sintético Y3.0 foi realizada com o kit MAXIscript™ (Ambion Inc., Texas, USA), conforme as recomendações do fabricante.

### **1.7. Análise da expressão de GFP do sistema viral Y3.0**

A partir dos transcritos de RNA obtidos *in vitro* foi realizada a transformação de protoplastos das diferentes linhagens de leveduras (Tabela 1), conforme o protocolo descrito por Russel *et al.* (1991). Após feita a regeneração das células em meio de cultura contendo 1M de sorbitol e isolamento de colônias, foi realizada a análise de expressão de GFP por microscopia de fluorescência e espectrofluorimetria. Em todos os casos, foi utilizado um controle positivo de expressão de GFP para fins de comparação por meio do uso do plasmídeo pRS316-GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Eric V. Shusta, University of Wisconsin-Madison, EUA) o qual contém o quadro aberto de leitura do GFP fusionado ao promotor forte e induzível por galactose *GALI-GAL10*.

## **Adendo II**

### **Resultados, Discussão, Conclusão e Perspectivas Complementares ao Pedido de Patente Intitulado:**

“Desenho e Construção Gênica compreendendo Sistemas Virais, Célula Transformada, Método de Expressão de Peptídeos e/ou Proteínas Heterólogas Fusionadas ou não e Composição Compreendendo o Mesmo”

## RESULTADOS

Nosso principal objetivo ao desenvolver este projeto “Uso de sistemas virais citoplasmáticos de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de proteínas heterólogas” era verificar se os ScV-M1 e/ou ScV-M28 modificados *in vitro* poderiam expressar e excretar eficientemente, em linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae*, peptídeos e proteínas heterólogos em meios de cultura completos e definidos, em ausência de qualquer pressão de seleção externa, seja esta química ou física.

Para tanto, primeiramente, deveríamos construir sistemas de transcrição *in vitro* contendo o cDNA do ScV-M1 ou ScV-M28 fusionados ao gene *URA3* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do bacteriófago SP6. Os sistemas seriam denominados de ScVURAM-I (para expressão viral intracelular de Ura3p) e ScVURAM-E (para a produção viral e secreção de Ura3p no meio de cultura). Posteriormente, introduziríamos, em esferoplastos de *S. cerevisiae ura3<sup>-</sup>*, os transcritos fita simples de RNA ScVURAM-I e ScVURAM-E; e verificaríamos a estabilidade e a eficiência da expressão viral de Ura3p por meio da sobrevivência das linhagens em meios de cultura definidos sem uracila bem como de ensaios espectrofotométricos específicos para detectar a atividade da proteína Ura3p das linhagens não-transformadas, transformadas e do meio de cultura após cultivo. Para este último objetivo seriam utilizados os extratos protéicos brutos, assim como a Ura3p purificada por métodos cromatográficos.

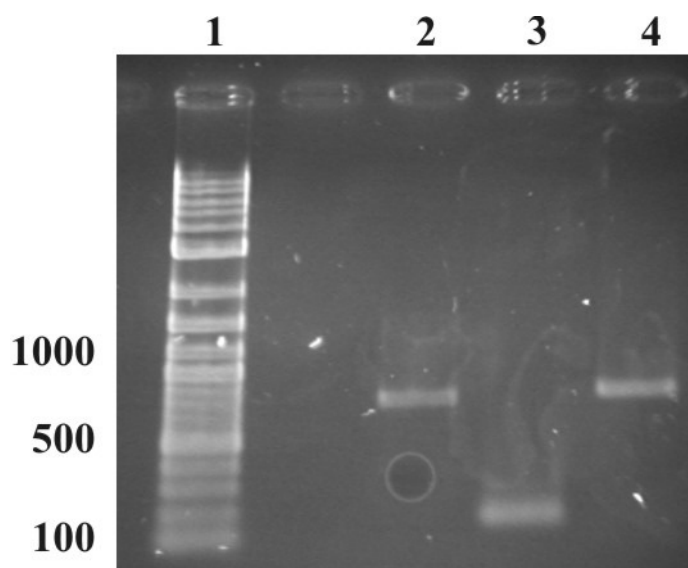
No entanto, devido à falta de tempo hábil para a realização das construções, e em meio a grande disponibilidade de construções sintéticas por meio de empresas de biotecnologia, optamos pela construção de um gene de expressão viral sintético.

Dentre os resultados preliminares obtidos nesta primeira fase do projeto constituem-se as amplificações dos fragmentos que seriam utilizados para as posteriores

construções

### 1. Amplificação dos fragmentos de DNA necessários para a montagem do sistema viral ScVURAM-E

Os fragmentos de DNA necessários para a montagem do sistema ScVURAM-E foram amplificados dos vetores pM1Pst-4 (o qual contém o vírus M1 de *S. cerevisiae* e serve de molde para a amplificação dos fragmentos 5'-NTR e 3'-NTR) e do YepLac33 (contém o gene *URA3*) por PCR e purificados em gel de agarose (Figura 01).

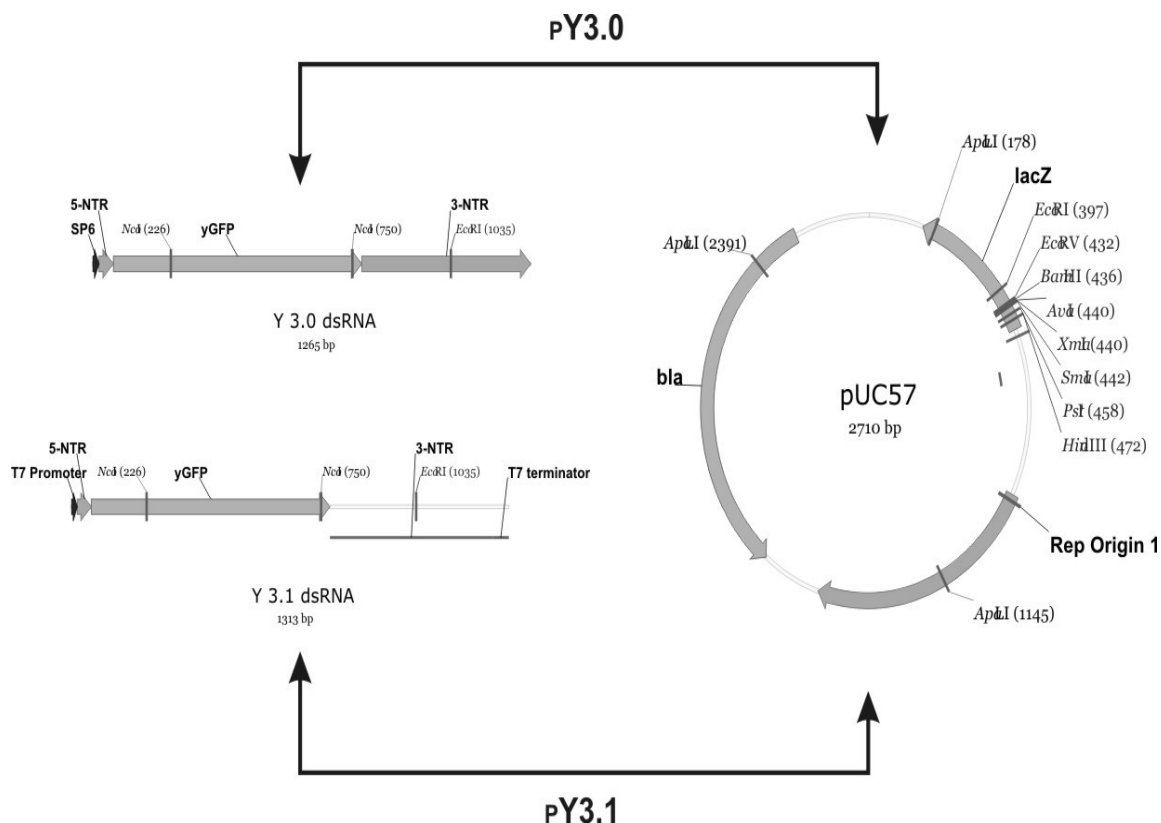


**Figura 01.** Gel de agarose 1% (p/v) contendo os fragmentos de DNA obtidos a partir de PCR dos plasmídeos pM1Pst-4 (fonte dos fragmentos 5'-NTR e 3'-NTR) e YepLac33 (*URA3*). O marcador de peso molecular do tipo *ladder* de 100 pb está representado na canaleta (1) com os fragmentos de 100pb, 500pb e 1000pb indicados a esquerda. Os seguintes fragmentos de DNA aparecem representados no gel de agarose: *URA3* (2), 5'-NTR (3) e 3'-NTR (4).

Esses fragmentos, uma vez obtidos, então deveriam ser montados e ligados em um vetor de clonagem bacteriana para a transcrição *in vitro* do RNA e transformação de linhagens de *S. cerevisiae*.

## **2. Desenho e montagem de um sistema sintético de expressão viral em *S. cerevisiae***

Com a disponibilidade cada vez maior de processos de síntese *in vitro* de genes e outras moléculas de DNA de grande tamanho (acima de 500pb) para a comunidade científica e considerando a limitação de tempo para a execução do projeto, iniciamos a construção de um sistema sintético de expressão de RNA em *S. cerevisiae* utilizando, para tanto, uma seqüência viral comumente presente em leveduras denominada de “X” este vírus é um mutante do vírus L-A e exerce para com este uma relação de dependência, assim como os vírus M, que são responsáveis pelo caráter *killer*. Foi fusionada à seqüência viral X o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* ou GFP). Esse sistema, denominado de “Y3.0”, foi colocado sob o controle do promotor SP6, o qual é reconhecido e transcrito pela RNA polimerase dependente de DNA do bacteriófago SP6 e Y3.1 quando colocado sob controle do promotor T7 (Figura 02). Todo o sistema foi sintetizado pela empresa Genscript Corporation (Piscataway, USA).

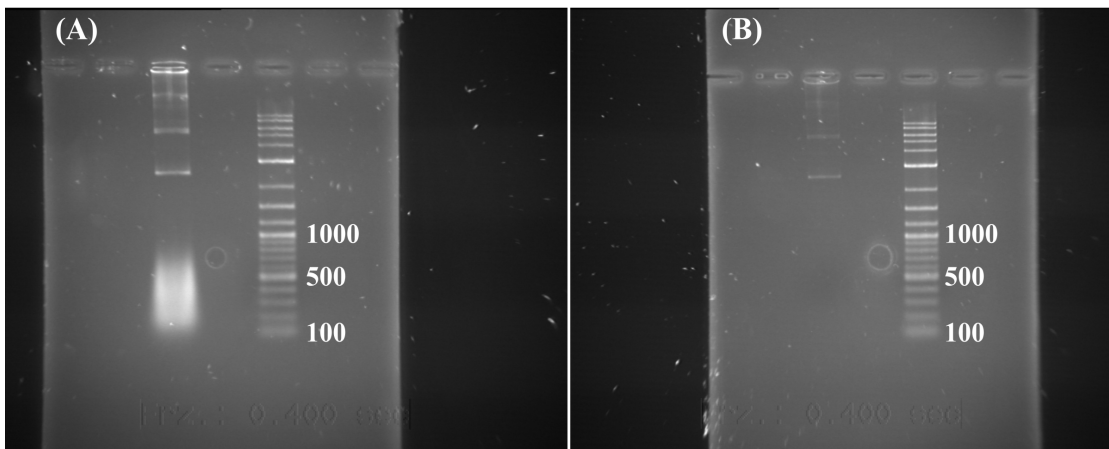


**Figura 02.** Sistemas virais sintéticos Y3.0 e Y3.1, derivados da fusão da partícula viral X (3'-NTR) de *S. cerevisiae* com o gene que codifica para a proteína fluorescente verde otimizada para expressão em leveduras (yGFP). O promotor SP6 (Y3.0) e T7 (Y3.1) e a região 5'-NTR (obtida do sistema X é utilizada para a excreção de proteínas no meio extracelular), estão representadas na figura. Ambas as construções foram ligadas ao vetor pUC57 de *E. coli*, gerando os plasmídeo pY3.0 e pY3.1.

### 3. Extração do plasmídeo contendo a seqüência gênica de interesse

Após o desenho e posterior síntese *in vitro* do sistema de expressão viral Y3.0 procedeu-se a extração dos plasmídeos de interesse por meio de lise alcalina com SDS, conforme o Protocolo 1 de Ausubel *et al.* (1987), visto que a linhagem de *E. coli* que foi fornecida pela empresa que efetuou a construção do sistema já encontrava-se transformada. O plasmídeo pY3.0, (o qual contém as seqüências do vírus X fusionadas

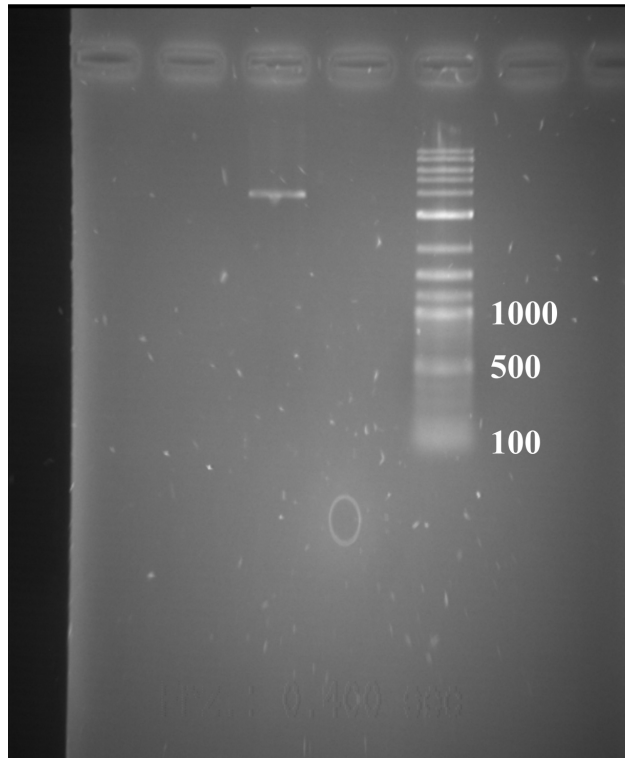
ao gene da proteína GFP) foi extraído de *E.coli* e pode ser visualizado na figura 03.



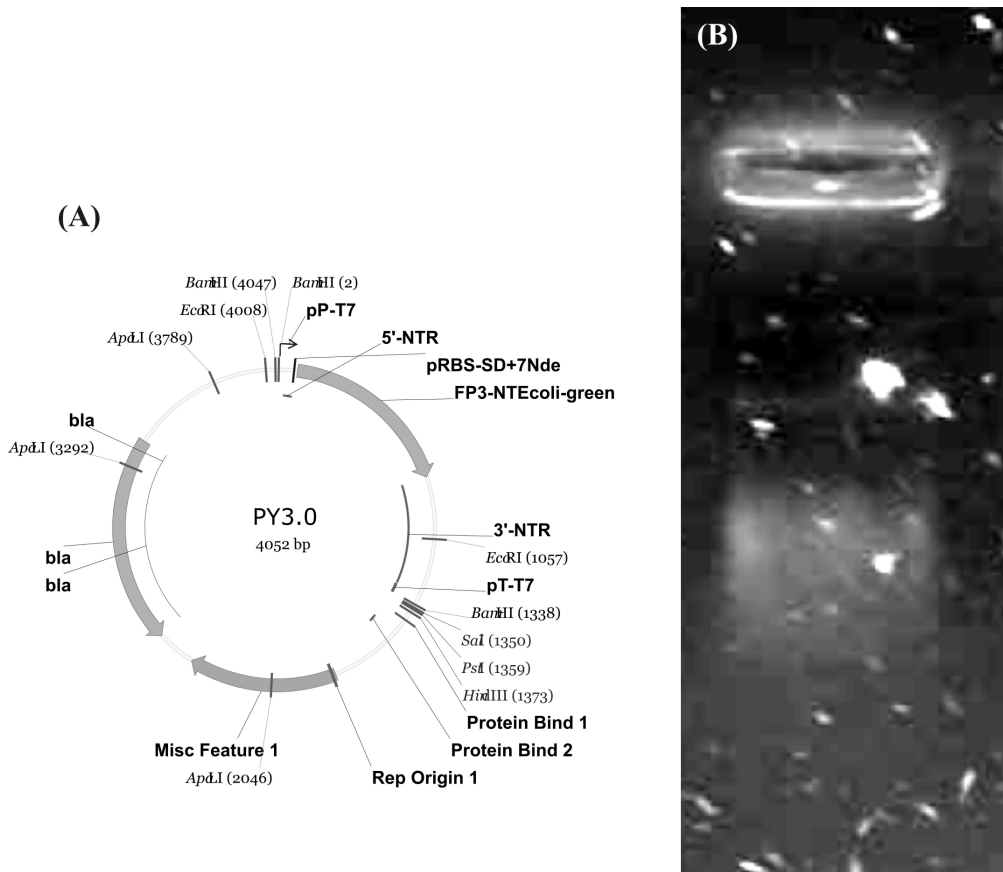
**Figura 03.** Gel de agarose 1% (p/v) contendo o plasmídeo de interesse Y3.0 (fonte dos fragmentos 5'-NTR e 3'-NTR). Em (A), a canaleta 3 contém o plasmídeo pY3.0 sem ser submetido ao tratamento com RNase. Em (B) a canaleta 3 contém o mesmo plasmídeo após tratamento com RNase. O marcador de peso molecular do tipo *ladder* de 100pb está representado na canaleta (5) com os fragmentos de 100pb, 500pb e 1000pb indicados à esquerda.

O plasmídeo pY3.0, foi então submetido a um processo de linearização por meio de tratamento com a enzima de restrição *Bam*H1 , segundo as instruções do fabricante do kit de transcrição *in vitro*. MAXIscript™ (Ambion Inc., Texas, USA) (Figura 04).





**Figura 04.** Gel de agarose 1% (p/v) contendo o plasmídeo de interesse pY3.0 (fonte dos fragmentos 5'-NTR e 3'-NTR). Na canaleta 3 o plasmídeo pY3.0 submetido à tratamento com a enzima *Bam*HI. O marcador de peso molecular do tipo *ladder* de 100pb está representado na canaleta (6) com os fragmentos de 100pb, 500pb e 1000pb indicados à esquerda.



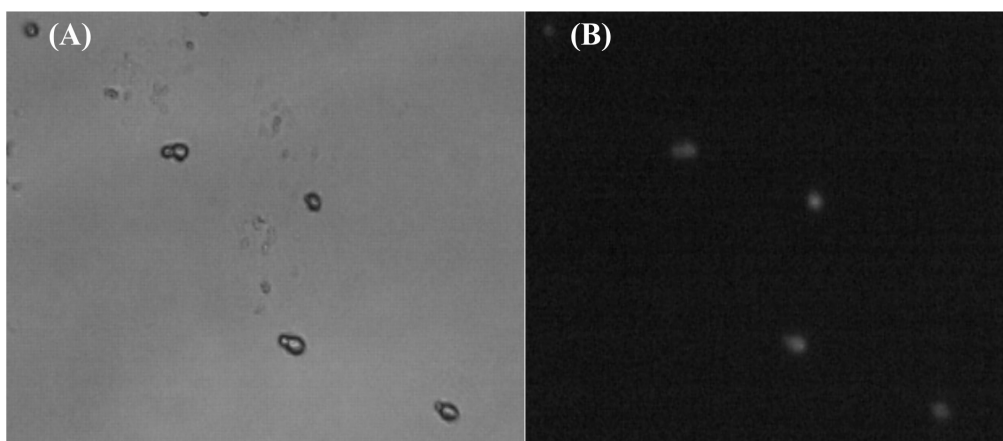
**Figura 05.** Em (A), mapa de restrição do plasmídeo pY3.0. Em (B), gel de agarose 1% (p/v) contendo transcrito obtido por meio de transcrição *in vitro*, conforme as especificações do fabricante.

#### 4. Análise da expressão de GFP

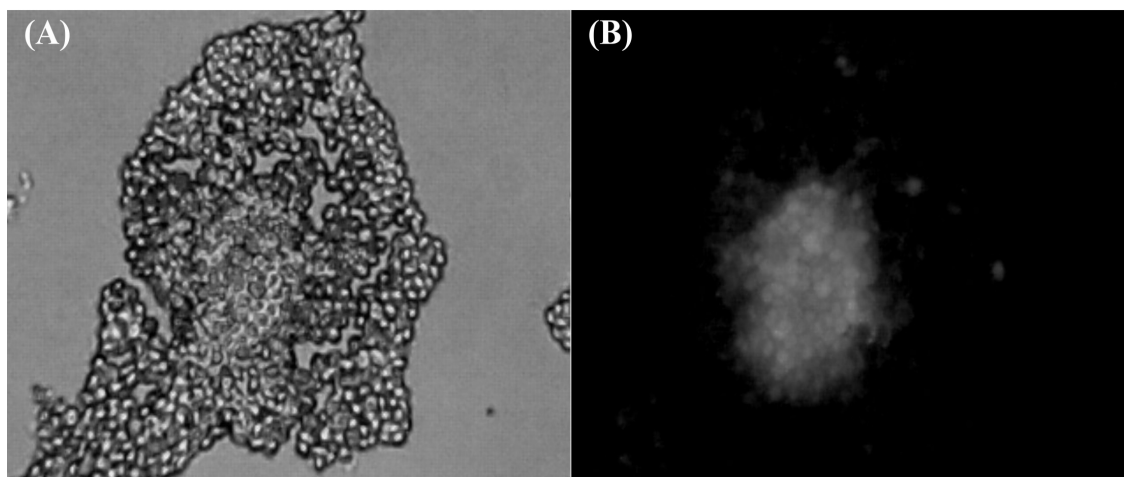
Tendo-se em mãos o transcrito de RNA, procedeu-se a transformação de protoplastos de leveduras conforme o protocolo descrito por Russel *et al.* (1991). Após feita a regeneração das células em meio de cultura contendo 1M de sorbitol e isolamento de colônias, procedeu-se a análise de expressão de GFP (*green fluorescent protein*) por microscopia de fluorescência e espectrofluorimetria. Em todos os casos, buscou-se utilizar um controle positivo de expressão de GFP para fins de comparação, o que foi facilitado pelo uso do plasmídeo pRS316-GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Eric V. Shusta, University of Wisconsin-Madison, EUA) o qual contém o quadro aberto de

leitura do GFP fusionado ao promotor forte e induzível por galactose *GALI-GAL10*.

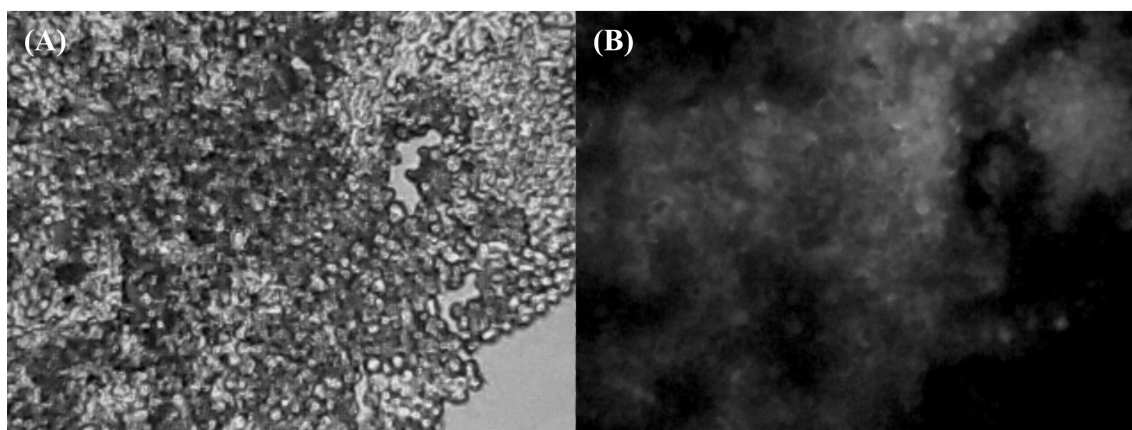
Assim, foi possível verificar que as células contendo o sistema viral Y3.0 apresentaram uma forte fluorescência quando observadas em microscopia de fluorescência (Figuras 06, 07 e 08). Da mesma forma, procedeu-se a comparação da eficiência de síntese de GFP por meio da expressão de RNA viral com sistemas de expressão plasmideal bem estabelecidos utilizando-se espectrofluorimetria (Figura 09). Os resultados demonstraram que a expressão utilizando o sistema viral é semelhante ao do sistema de expressão plasmideal. Nesse sentido, é importante salientar que as condições de expressão não foram otimizadas para o sistema viral.



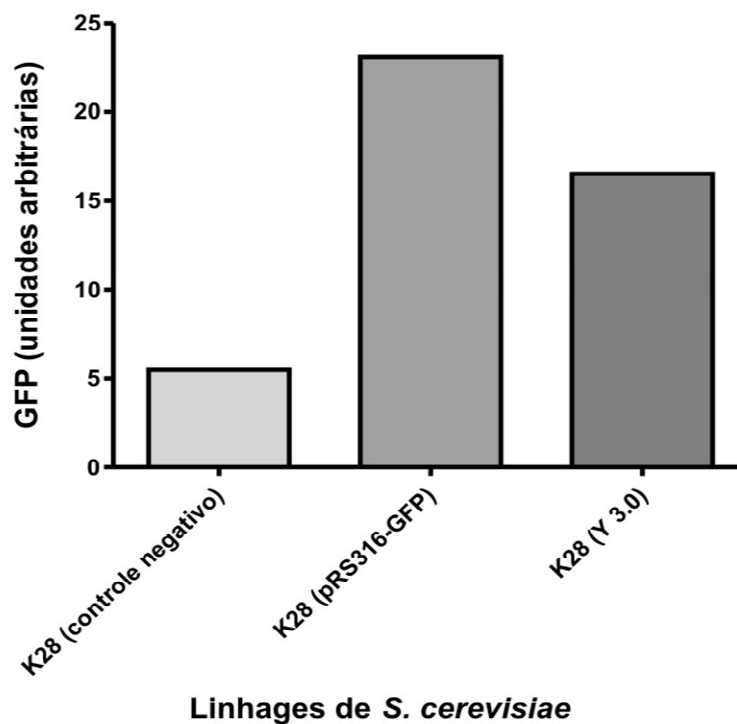
**Figura 06.** Análise da expressão do sistema Y 3.0 (expressão de GFP) na linhagem K28 de *S. cerevisiae* em microscopia de fluorescência K28 (A e B) Em (A), as células de *S. cerevisiae* K28 contendo o sistema Y3.0 observadas em microscopia óptica convencional, seguido de sua visualização em microscopia de fluorescência (B), onde se observa a fluorescência das células, expressão de GFP.



**Figura 07.** Análise da expressão do sistema Y3.0, por meio da expressão de GFP na linhagem GG100 14D de *S. cerevisiae* em microscopia de fluorescência (A e B) Em (A), as células de *S. cerevisiae* GG100 14D contendo o sistema Y 3.0 observadas em microscopia óptica convencional, seguido de sua visualização em microscopia de fluorescência (B), expressão de GFP.



**Figura 08.** Análise da expressão do sistema Y 3.0, expressão de GFP na linhagem GG100 14D de *S. cerevisiae* em microscopia de fluorescência (A e B) Em (A), as células de *S. cerevisiae* GG100 14D contendo o sistema Y 3.0 observadas em microscopia óptica convencional, seguido de sua visualização em microscopia de fluorescência (B), expressão de GFP.



**Figura 09.** Análise de expressão heteróloga de GFP baseado no sistema Y3.0 na linhagem K28 de *S. cerevisiae* por espectrofluorimetria. Como controles de expressão foram utilizadas (i) a mesma linhagem contendo um sistema de expressão de GFP bem estabelecido (pRS316-GFP) e (ii) as células K28 sem a presença de um sistema de expressão de GFP.

Assim, este sistema apresentou-se capaz de expressar a proteína heteróloga GFP em níveis satisfatórios sem a presença de pressão de seleção externa ou mesmo otimização do sistema, em níveis similares quando comparados ao controle positivo.

## DISCUSSÃO

Nosso objetivo inicial ao desenvolver este sistema de expressão viral Y3.0 era verificar a competência deste sistema de expressão viral, ou seja a sua funcionalidade. Seria possível induzir a expressão de proteínas heterólogas sem a necessidade da manutenção de pressão de seleção, utilizando para isso apenas seqüências virais, mimetizando a replicação viral na levedura *Saccharomyces cerevisiae*? Nossa surpresa não foi apenas o fato do sistema se mostrar competente e funcionante, dado termos conseguido expressar a proteína heteróloga GFP, mas a alta expressão da proteína heteróloga GFP obtida pelo sistema.

Atualmente a produção de proteínas heterólogas desperta um grande interesse na indústria biotecnológica e apresenta-se como um mercado em expansão e muito lucrativo, aliado a isto está a necessidade da produção cada vez maior de proteínas de aplicação clínica. As pesquisas na elucidação de comportamentos celulares e participação de mediadores e sinalizadores bioquímicos e imunológicos tem se revelado uma prática clínica interessante.

Sabe-se que a demanda global por proteínas recombinantes tem se acelerado nos últimos 20 anos. Estas proteínas possuem uma ampla gama de aplicações importantes como as vacinas, as proteínas terapêuticas, enzimas industriais, bem como novos materiais e componentes de nano-partículas de aplicações variáveis (Lico *et al.*, 2008). Em geral, são quatro os sistemas utilizados para expressão de enzimas e proteínas terapêuticas: bactérias, leveduras, baculovirus e mamíferos. O sistema bacteriano de expressão oferece facilidade de manipulação em sistemas de larga escala, enquanto o sistema que utiliza baculovirus acrescenta propriedades de modificação protéica, processamento e dobramento de proteínas complexas. Sobre estas vantagens, as células

de mamíferos permanecem os hospedeiros preferenciais para muitas proteínas eucarióticas de importância farmacêutica, particularmente aquelas que requerem modificações pós-traducionais (Arya *et al.*, 2008). No entanto esta tecnologia tradicional não consegue satisfazer a demanda deste mercado emergente (Lico *et al.*, 2008).

A levedura *S. cerevisiae* é frequentemente utilizada na biotecnologia, incluindo processos fermentativos na indústria alimentícia, produção de proteínas heterólogas, de bebidas e biomedicina. A expressão exata dos genes selecionados é essencial para todas estas três áreas. Sistemas que podem ser regulados são particularmente interessantes pois permitem o controle dos níveis de expressão gênicos (Maya *et al.*, 2008). O fato da levedura *S. cerevisiae* apresentar sistemas virais altamente adaptados e geneticamente caracterizados com replicação autônoma presente no citoplasma da célula, não estando sujeito às regulações de expressão gênica nucleares, incluindo, neste caso, possíveis silenciamentos gênicos ou efeitos epigenéticos que diminuem a expressão gênica e, conseqüentemente, a quantidade final de proteína heteróloga por biomassa obtida são vantagens importantes que o sistema de expressão VLP apresenta (Wickner, 1996; Dinman *et al.*, 1991; Fujimura *et al.*, 1992). No nosso trabalho optamos pelo vírus X, que aliado ao seu elevado número de partículas por células (1 até 8) é considerado um vírus não infectivo, e em infecções mistas com o vírus M (que também compete pelos VLP do L-A) apresenta preferência na infecção (Esteban *et al.*, 1988).

A secreção de proteínas heterólogas, por sua vez, envolve todo o processo de síntese proteica, empacotamento da proteína, e a trajetória da secreção protéica. Trata-se de um processo complexo, cuja otimização depende da compreensão de todas as etapas do processo. Assim, a levedura apresenta inúmeros estudos para a otimização da produção de proteínas heterólogas o que a torna um importante modelo de expressão de

proteínas heterólogas (Valenzuela *et al.*, 1982; Pfeiffer *et al.*, 1988; Kirnbauer *et al.*, 1992; Schmitt & Breinig, 2002, Kruger *et al.*, 2006; Ulmer *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008).

Um dos grandes problemas da expressão de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* é os baixos índices de secreção das proteínas recombinantes. No entanto ferramentas moleculares como a super expressão de algumas proteínas secretórias tem se mostrado promissoras. O incremento na secreção proteica de *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo conseguido por meio da super expressão de genes como CCW12, CWP2, ERO1, RPPO e SED1. Porém existe uma certa especificidade com relação ao tipo de proteína que está sendo secretada e o gene superexpresso. Até agora, o único gene que demonstrou incremento na secreção de múltiplas proteínas foi o gene que codifica a subunidade ribossomal RPPO (Wentz & Shusta, 2008). Nosso modelo de expressão Y3.0 apresenta uma significativa vantagem adaptativa nestes casos, pois aproveita a mesma rota de secreção utilizada para a excreção de proteínas killer.

Proteínas humanas já foram expressas com sucesso na levedura, e se mostraram fisiologicamente ativas, além disso, este sistema também foi capaz de confirmar o seu papel celular, como por exemplo, a função de receptores de membrana de progesterona (Smith *et al.*, 2008). No entanto, um dos grandes problemas da síntese de proteínas terapêuticas, cujo objetivo é o uso em mamíferos utilizando modelos como fungos filamentosos ou mesmo sistemas de expressão bacterianos é a diferença na glicosilação das proteínas produzidas, quando comparadas às proteínas produzidas por mamíferos. Embora já se tenham modelos disponíveis de “sistemas humanizados” (Hamilton *et al.*, 2006). Nestes casos, a presença de seqüências de processamento pós-traducionais tornam o sistema VLP atrativo para a expressão e secreção de proteínas humanas ativas e em grandes quantidades, as quais requerem extensivas modificações pós-traducionais,



tais como N-glicosilação, fosforilação e acetilação (Ribas & Wickner, 1998; Srivastava & Lal, 2003; Porro & Mattanovich, 2004).

A busca constante no aperfeiçoamento dos sistemas de expressão de proteínas heterólogas também visa à diminuição do impacto ambiental e da formação de resíduos. Hoje um dos mais difundidos modelos de expressão de proteínas heterólogas é a levedura *Pichia pastoris*, utiliza-se neste processo a indução da expressão por meio do metanol (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). O nosso sistema por utilizar a levedura *S. cerevisiae* que não é metilotrófica, e logo não utiliza metanol, utiliza para tanto fontes limpas de carbono, podendo utilizar mesmo resíduos como soro de leite ou mesmo o bagaço de cana, constitui-se uma tecnologia limpa e reciclável.

A grande versatilidade do sistema Y3.0 garante a sua aplicação em diferentes sínteses. O limite consiste no tamanho da molécula que se deseja expressar, pois esta deve ser capaz de se envelopar nos VLP do L-A e este possui 4,6kb (Hopper *et al.*, 1977, Fujimura & Wickner, 1988; Icho & Wickner, 1989). Nosso sistema foi expresso primeiramente em leveduras que possuíam o vírus L-A, no entanto estão disponíveis leveduras com caráter superkiller, estas linhagens apresentam mutações nos genes *superkiller* para levedura (*SKI*) que foram originalmente identificados por meio de mutações que incrementavam a secreção da toxina codificada pelo vírus M. O gene *SKII* codifica uma 5'-exoribonuclease citoplasmática responsável pela maioria do *turnover* do RNA citoplasmático (Vondrejs *et al.*, 1983). Além disso, os genes *SKI2*, *SKI3*, *SKI8* codificam para proteínas que são necessárias para a degradação 3' do RNA mensageiro e para a repressão da tradução de RNAs sem cauda de poli-adenosina (Masison *et al.*, 1995). Assim, nosso sistema apresenta a possibilidade de ser otimizado, podendo atingir níveis de expressão próximos ou superiores aos convencionais.

A crescente demanda por produtos biotecnológicos produzidos com baixo impacto ambiental e com altos índices de produção, quer sejam de proteínas, quer sejam de vacinas, ou mesmo de peptídeo tem impulsionado as pesquisas com novos modelos de expressão de proteínas heterólogas. O sistema de expressão viral Y3.0 assim, representa uma importante ferramenta biotecnológica, agrega inúmeras vantagens aqui já listadas, e embora nossas pesquisas ainda estejam em estado inicial, apresentam resultados promissores, o desafio agora é expressar demais proteínas heterólogas e verificar se a eficiência do sistema se mantém.

## **CONCLUSÃO GERAL**

1. O sistema de expressão viral Y3.0 foi capaz de expressar a proteína heteróloga de interesse (GFP);
2. Os níveis de expressão da proteína heteróloga foram satisfatórios;
3. Foi possível expressar proteínas heterólogas utilizando para tanto apenas as seqüências virais do vírus X fusionadas ao gene de interesse (GFP);
4. Este sistema inédito de expressão de proteínas heterólogas também apresenta uma grande versatilidade, capaz de vir a ser explorado na indústria biotecnológica de vacinas, peptídeos, proteínas terapêuticas ou mesmo enzimas.

## PERSPECTIVAS

1. Aumentar os níveis de expressão por meio da utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com caráter *superkiller*;
2. Analisar a presença das proteínas heterólogas expressas pelo sistema viral sintético pela técnica de *imunoblotting*;
3. Avaliar a expressão de outras proteínas heterólogas que não o GFP; como a expressão de proteínas terapêuticas como interleucina-2 (revisão das aplicações clínicas e fisiologia em anexo) e albumina.
4. Utilizar como promotor do sistema de expressão viral o promotor T7 e induzir a expressão deste sistema *in vivo* em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que expressem o fenômeno *superkiller*;
5. Avaliar a atividade das proteínas heterólogas expressas pelo sistema viral.

## **ANEXO**

**Interleukin-2, new clinical applications and properties**

**Manuscrito em fase de redação a ser submetido**

## **Interleukin-2, new clinical applications and properties**

Queli Defaveri Varela and Diego Bonatto\*

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do sul, RS,

Brazil

Short title: Interleukin-2

**\*Address to wich proofs should be sent:**

**Diego Bonatto**

Laboratório de Genética Toxicológica-206

Instituto de Biotecnologia-Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Universidade de Caxias do Sul-UCS

Rua Francisco Getúlio Vargas 1130-Bloco 57

Caixa Postal 1352

Caxias do Sul- Rio Grande do Sul

Brazil

95070-560

Telephone number: 55-54-3218-2100 (2682)

Fax: 55-54-3218-2293

Email: [diegobonatto@gmail.com](mailto:diegobonatto@gmail.com)

Contract/grant sponsor: CNPq, FAPERGS.

## **Abstract**

The interleukins are cytokines immune-modulated that act through a quaternary complex signaling receiver. Among the interleukins, interleukin-2 has already been approved by the FDA for some treatments, and its use has had success emerging in the treatment of many diseases. New insights have suggested the use of interleukin-2 in the treatment of AIDS due to the increase of T lymphocytes (CD4) in patients receiving antiretroviral treatment with co-administration of interleukin-2. Thus, the interleukin-2 has been shown to be effective in many protocols where the diversity of applications and the success of some attempts drew attention. However, the cost benefit to the patient and the costs of treatment and combination with therapies already pre-set should be evaluated on a careful way. Thus, information regarding the use of interleukin-2 becomes indispensable in modern medicine, this article aims to report the main applications of interleukin-2 reported in the literature as well as reviewing the structure, interactions and physiology of this cytokine.

**Keywords:** IL-2, Treg, cytokine, T cells, immune system.

## **Introduction**

Interleukin-2 (IL-2) is an important cytokine capable of control immune cell function, produced almost exclusively by T cells when there is an antigenic stimulation. IL-2 is important in the adaptive immune system, because IL-2 has the ability to control the clonal expansion and homeostasis of peripheral T cells [1]. IL-2 belongs to a family of cytokines (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21). IL-2 presents 15.5 kDa; 133 amino acids; four-helix bundle, localized in chromosome 4q26 and with four exons, the main site of IL-2 synthesis are T cells. The regulation of IL-2 contemplates transcriptional level regulation, and stabilization of mRNA [2,3,4].

### **1. IL-2 Structure and function**

The cytokines IL-2, IL-15, and IL-7 are extremely important for regulating lymphoid homeostasis. These cytokines show almost the same responses from lymphocytes in vitro, but play divergent roles in lymphoid biology in vivo (table 1) [5]. The receptors of IL-2 are formed of IL-2R $\alpha$ , IL-2/15R $\beta$ , and  $\gamma$ c. IL-2R $\alpha$  is specific for IL-2, link IL-2 with low affinity and has a short cytoplasmic domain. The  $\gamma$ c gives the ability of IL-2 (and other  $\gamma$ c cytokines) to incite MAP kinase and PI3 kinase pathways that lead to signals of antiapoptotic and mitogenic, figure 1 [6].

A chain IL-2/15R $\beta$  is shared by the IL-15 receptor; this receptor is responsible for stimulating dependent signaling pathways that support the survival of the cells, and their proliferation. The three chains: CD25, CD122, and CD132 make up the trimeric IL-2R that has an extremely high affinity for IL-2,  $\alpha$  (CD25) has a very rapid combination rate,  $\beta$  (CD122) contributes a low combination rate. IL-2R  $\alpha$  and  $\beta$  chains



bind to one another, but it is important to note that the  $\alpha$  chain does not bind to the  $\gamma$  chain, so, probably the dimer  $\alpha$ - $\beta$  is formed on the surface of antigen-activated T cells, and it can serve as the first receptor complex capable of binding IL-2 [7]. So, once formed, this trimeric complex can form a quaternary complex attracting and binding the  $\gamma$  chain [7].

The signal transduction mediated by IL-2R and IL-15R involves common JAK (Janus kinase) and STAT (signal transducer and activator of transcription), as they have the same  $\beta$  and  $\gamma$  subunits [2,8,9] (figure 1). The phosphorylation of the SRC-family protein tyrosine kinases LCK (lymphocyte specific kinase) and SYK (spleen tyrosine kinase) can be induced by the signalling pathways induced by IL-2- and IL-15, as well as the induction of expression of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma 2 (BCL-2). Another important pathway that can be induced by this signalling is the stimulation of the phosphatidylinositol-3-kinase–AKT pathway, and stimulation of the RAS–RAF–mitogenactivated- protein-kinase pathway, that activated FOS- and JUN-containing transcription-factor complexes [10].

First, IL-2 was described as a major stimulant of T lymphocytes in vitro, later, was showed that this ability could be replaced by other cytokines (figure 2). But in vivo, IL-2 plays a unique role in the control of lymphoproliferation, in the generation and maintenance of T regulatory cells (Treg) [11]. IL-2 can act as both, a immunomodulatory or a immunostimulatory cytokine (table 2). A common  $\gamma$  chain binding cytokines such as IL-4, IL-7, and IL-15 can help to sustain Treg cell survival in vitro by the supply of signals of anti-apoptosis [12]. Any way, IL-2 presents a necessary role in the homeostasis of Treg cell [13].

The induction of STAT5 phosphorylation and up-regulation of FoxP3 (a key identifier of regulatory T cells) in Tregs can be done by IL-7 and IL-15. The activation

of STAT5 is related to increase of viability. However, the potent suppressor function is obtained only in the presence of IL-2. In contrast, IL-21 can't stimulate STAT5 but can activate STAT3 and presents no effect on Treg (viability, stimulation, or function), as IL-7 and IL-15 are not able of inducing powerful Treg suppressor function [14].

The IL-2/IL-2R interaction is important for expansion and peripheral homeostasis of Treg cells [15]. In T cells, one of the most potent inducers of CD25 and Bcl-2 expression is IL-2 [16]. Bcl-2 is an anti-apoptotic effector [10], and its loss occurs at an early state of apoptosis rather than the loss of the integrity of the cytoplasmic membrane and the sequential sensing by the scavenging system. It has been proposed that the reduced expression of IL-2 and IL-2 regulated genes such as CD25 and Bcl-2 on Treg cells and a Treg cell survival defect is secondary to an IL-2 deficiency [17]. Anyway, IL-2 is associated with important immunological processes and to the treatments of a lot of diseases too.

## **2. The *Quantal* Theory**

The complete behavior of the immune system is still not completely understood. Along the years, one of the ideas proposed to explain how the immune system discriminates between self and non self was based in the "Clonal Selection Theory" proposed in 1955. This theory is a proposal in the decision "all or none" where the proliferation of antigen-selected cell clones is determined by a crucial number of cellular receptors triggered by the T cell growth factor (TCGF), their activity in IL-2 drives T cell proliferation [18]. According to that, so, the number of triggered antigen receptors will determine the *quantal* decision [7]. The progress or not of the cell cycle is made by the *quantal* decision, controlling the clonal expansion. In immunological

synapses, *quantal* decisions results in different occurrences in the cells, which are ultimately determined by IL2R gene expression [19].

### **3. IL-2 Physiology**

The complete physiology for IL-2 in Tcells is not totally elucidated. It is know that IL-2 signaling may play a main role in the differentiation of Tregs, a group of CD4+ T cells that expresses high levels of IL-2R $\alpha$  and IL-2/15R $\beta$ , and the transcription factor FoxP3 [20]. The transcription factor thymus-derived CD4+CD25+forkhead box P3+ (FoxP3+) was considered as a marker distinguishing Tregs from CD4 T cells [21]. Stimulation of Tregs with IL-2 results in increased of the expression of FoxP3 [22]. IL-2 plays a crucial role in the FoxP3+ naturally occurring and is necessary for Treg homeostasis and activation. [14].

There are two isoforms of the expression of the forkhead/winged helix transcription factor (Foxp3) in humans: the full-length isoform (Foxp3FL) and another alternative-splicing product without the exon 2 (Foxp3DeltaE2), they presents alike capacities to induce Treg; however, unnaturally high expression levels are required to induce Treg functions to CD4(+)/CD25(-) cells [23]. The connection of IL-2 to its receptor initiated a process that started with the phosphorylation of STAT5, and binding of phosphorylated STAT5 to the foxp3 promoter enhances foxp3 transcription, resulting in elevated levels of FoxP3 protein in Tregs. The transcriptional regulation by the FoxP3 is considered essential for the development of strong suppressor function in activated Tregs [14].

Mice deficient in IL-2- and IL-2R are not completely unprovided of Foxp3+ cells, but rather lack population of mature CD4+CD25+Foxp3<sup>high</sup> Treg cells and have just a few immature CD4+CD25-Foxp3<sup>low</sup> T cells. It is interesting to note that common  $\gamma$ c knockout mice have an almost complete absence of Foxp3+ Treg cells, enclosing the immature CD25-Foxp3<sup>low</sup> subset. Some other  $\gamma$ c-cytokines must be important in the thymic development of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells besides IL-2 [15].

#### **4. IL-2 expression**

T-cell activation culminates in signaling pathways that ultimately results in induction of gene transcription from the IL-2 promoter [24]. Cells that are unresponsive to new antigen receptor engagement (anergic T cells) are not capable of induce the production of IL-2. Changes in histone acetylation can be induced by anergizing stimuli that mediate transcriptional repression of IL-2 expression. Anergic T cells increase the expression of Ikaros (a zinc finger transcription factor crucial for lymphoid lineage determination) in response to calcium signaling. Ikaros induces histone deacetylation when binds to the IL-2 promoter [25].

The regulation of the IL-2 transcription is reported to interleukin-2 enhancer binding factor 2 (ILF2), it is important to note that the ILF2 gene can present differences according to the specie. Tetraodon ILF2 gene presents fifteen exons, one more than other known ILF2 genes in human and mouse. Genes up and down-stream from the Tetraodon ILF2 were Peroxin-11b, Smad4, Rpa12 Snapap and Txnip homologue, which were different from that in human and mouse [26].

Zinc is an important element that is necessary for the activation and gene expression of both IL-2 and IL-2R $\alpha$  and beta in HUT-78 (a Th0 human malignant lymphoblastoid cell line) and required for Nuclear Factor-kappaB. In this study, it has

been reported for the first time that zinc is also required for gene expression of IL-2 and IL-2R $\alpha$  in primary cells [27].

Recently, was identified a child born with a genetic deficiency of IL-2 receptor alpha (IL-2 $\alpha$ , CD25) expression. This child had some clinical manifestations of primary biliary cirrhosis (PBC). In addition, there has been evidences in both patients with PBC and their first-degree relatives that a deficiency of Tregs is an integrate component for susceptibility to PBC [28]. However some proceses remain without explanation, antigen-activated CD8+ T cells with a stem cell-like capability for maintaining proliferative potential seems to be independent of IL-2 [29].

The complex structure of IL-2 consists of quaternary receptor, as discussed before. The structure of  $\gamma(c)$  is a rationale for loss-of-function mutations present in patients with X-linked severe combined immune deficiency diseases (X-SCID) [30]. Gene therapy with gammaretroviral vectors was used to treat individuals with X-linked SCID (SCID-X1) to restore the missing IL-2 receptor gamma (IL2RG) gene to CD34(+) BM precursor cells. The successful of the chemotherapy treatment was associated with restoration of polyclonal transduced T cell populations what was obtained in 3 of 4 cases [31]. Antibody/IL-2R chimeras could mimic the wild-type IL-2R signaling, suggesting the potential application in expansion of gene-modified T cells [32]. Cytokines are reported to be associated with the formation of prostate cancer, so was identified that it is associated to IL-2 gene C/T polymorphism [33].

## **5. IL-2 for Treg differentiation**

IL-2 is clearly essential for Treg differentiation (figure 2) although why this subset of T cells is uniquely sensitive to IL-2 is currently unclear. Expression of IL-2, IL-2R $\alpha$ , and IL-2R $\beta$  are all induced in T cells after T cell receptor engagement.

Thereby, the main physiological role for IL-2 signals in naive T cell homeostasis involves the indirect role of IL-2 in corroborating Tregs, which by the end regulate naive T cell activation and memory phenotype T cells. In the adaptive immunity the response to microbial infections includes clonal expansion of antigen-specific CD8+ T cells. Although, IL-2 has been considered to be primarily responsible for this process because normal expansion occurs without IL-2 receptor signaling [34].

The physiological role of cytokines includes function and generation of Tregs. IL-2 transforms immunoregulatory molecules have showing to control the generation of Tregs [35]. When in periphery, natural Tregs are highly dependent on exogenously supply IL-2 for their survival in these sites. The development of Tregs or self-reactive T cells can be affected by deficiency or functional alteration of other molecules, in addition to Foxp3 and IL-2/IL-2 receptor expressed by T cells or non-T cells, and consequently disbalances of the two populations [36].

Paracrine or systemic IL-2 signals positively support the expansion of antigen-specific CD8+ T cells whereas autocrine signaling of IL-2 may restrict their expansion [37,38]. IL-2 supports the differentiation of IL-2R $\alpha$ -expressing Tregs, thereby keeping T cell tolerance, the immunoregulatory actions of IL-2 included the expansion of recently activated T lymphocytes (figure 3) [34].

IL-2 could induce up to 90% of CD4(+) T cells to become Foxp3(+) and able to mediate suppression *in vitro* with solid-phase anti-CD3 monoclonal antibody in the presence of transforming growth factor beta (TGF-beta) and IL-2. CD11c(+) dendritic cells were involved in the conversion process, and when modified in the presence of TGF-beta, they get transform Foxp3(-) CD4(+) cells into Foxp3(+) CD4(+) cells by producing TGF-beta. The transformed cells had suffered cell division, and most of them

expressed activation markers along with surface. These molecules would facilitate their migration into tissues [39].

In more advanced stages of mycosis fungoides the patients presents an inflammatory reaction with intensive activation of T cells, as can be seen by the sIL-2R levels and Th2 cytokines overcoming the main Th1 cytokine (IFN $\gamma$ ). Increased levels of sIL-2R, IL-4, and IL-10 accompanied the increase in concentrations of acute phase proteins. Probably these increases are due to the activation of T-helper lymphocytes [40]. IL-2 predominantly supported MNC (mononuclear cells) functional activity rather than inhibited lymphoid MNC apoptosis in in vitro cultures with cytostatic drugs of peripheral blood from healthy subjects and children with cancer [41].

IL-2 can be associated with diabetes type 1. Significant association with diabetes type 1 was also found in the region on chromosome 4q27 containing the IL2 gene and homologous to the susceptibility locus *idd3* in non-obese diabetic (NOD) mice. The  $\alpha$ -chain encoded by the IL2RA (CD25) gene is a substantial component of the high-affinity receptor molecule highly expressed by activated T lymphocytes [42].

In chronic virus infections polyfunctional, i.e. interleukin-2 and interferon- $\gamma$  secretion and also proliferation represent relates to protective antiviral immunity [43]. Interleukin-2 is implicated in the agonistic stimulation of immune responses, and seems to be crucial to keeping peripheral tolerance by supporting the survival and function of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells [44].

T cells from patients with systemic lupus erythematosus produce decreased amounts of IL-2, which is considered a central cytokine in the regulation of the immune response [45]. The elimination of self-reactive T cells to prevent autoimmunity is the unique function of IL-2 in autoimmunity [46].

## **6. Immunotoxins**

Immunotoxins are proteins that contain a toxin along with an antibody or growth factor that binds specifically to target cells. For the immunotoxin to function it must bind to and be internalized by the target cells, after this, the enzymatic fragment of the toxin must be translocated to the cytosol where is capable of take the cell to death. Immunotoxins are between the most potent killings agents [47].The elucidation of the physiological role of cytokines has providing new strategies for therapeutic approach. A number of approved cytokines including IL-2, interferons, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) as well as novel cytokine antagonists [48].

Immunotoxins have been developed for several decades to target hematologic malignancies. Denileukin diftitox is the only approved drug containing a protein toxin, a fusion of human interleukin 2 with truncated diphtheria toxin. Denileukin diftitox has been effective in cutaneous T-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, and non-Hodgkin's lymphoma [49]. Recombinant proteins are being developed and will be a new alternative of treatment of hematologic malignances in the future. IL-2 has been used in the clinic for treatment of cancer since 1980's, in the beginnings their application was limited by the expansion of Treg cells [50].

## **7. IL-2 Treatments with IL-2**

Novel insights into the functional role of IL-2 signaling in experimental have expanded its clinical applications, it has been implicated in a lot of diseases pathways, and some patients could be benefited with these treatments.

Some clinical evidences indicated that Treg cells are implicated in the control and progression of diabetes. The diabetes was accelerated by the disruption of Treg cell



development and homeostasis by blocking the IL-2 activity in non-obese diabetic mice [51]. IL-2 in a low-dose management promoted Treg cell survival and protected mice from developing diabetes. So, a dysfunction in Treg cell when related to production of IL-2 is related to the progress of diabetes in nonobese diabetic mice [52].

Patients with allergy and asthma presents a chronic mucosal inflammation mediated by CD4<sup>+</sup> Th2 lymphocytes and their cytokines. The mechanism of this pathology is still not clear; some patients (allergic individuals) make a Th2-type T-cell response whereas other (non-allergic) do not. Regulation of T cells could be involved in this process; and regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells have been described in both mice and humans models. The expression of the forkhead transcription factor, Foxp3 was related to suppressive phenotype [53]. The block of the IL-2R  $\beta$ -chain have been proposed to be useful for therapy of allergic asthma in humans [54].

IL-2 when administrated in a high-dose and continuous infusion induce the production of Lymphokine-activated killer (LAK) these cells have the ability to lyse melanoma and kidney cancer cells nonspecifically. The combined treatment famotidine with prior IL-2 increased cytotoxicity of LAK against tumor cells in patients with metastatic kidney cancer or melanoma [55]. IL-2 has been approved for use in patients with metastatic renal-cell carcinoma and malignant melanoma. The IL-2 mechanism in these process can be explained by the expansion of lymphocytes by with consequent inhibiting of tumor growth [56,57].

IL-2 and interferon (IFN)- $\alpha$ ,  $\gamma$  constituted the treatments of choice for metastatic RCC. IFN-alpha is most widely used in Japan [58]. In these treatments, the administration of a high bolus dose of IL-2 has been more efficacious than low dose [59].

The Interleukin-2/rituximab can be an alternative supportive treatment when administered after autologous stem cell transplantation with manageable of its toxicity to avoid non-Hodgkin's lymphoma that remains a problem after autologous stem cell transplantation, however the risks to the patient must be taken into account [60].

Infusional IL-2 can be used in cancer treatment. IL-2 increases lymphokine-activated killer cell (LAK) cytotoxicity against kidney cancer in vitro and in vivo. The combination of infusional IL-2 with famotidine is active in metastatic kidney cancer [61]. Immunotherapy with IL-2 and interferon-alpha has been the only viable option in metastatic renal cell cancer for almost two decades, new therapeutic strategies are being used but IL-2 still is the standard treatment in these cases [62].

The susceptibility of multidrug resistant (MDR) cancer cells to immune effectors, with P-glycoprotein (P-gp) expression in immune effector subsets, have suggesting that P-gp or some changes associated with it have implicated in immune-mediated mechanisms. IL-2 treatment combined with current protocols, chemotherapeutics, monoclonal antibodies (mAbs) and stem cell transplantation in a breast carcinoma line and its MDR1-transfected variants [63].

The association of thalidomide and IL-2 was tested in patients with metastatic RCC refractory to both immuno- and chemotherapy. However, toxicity and costs are considerable, so thalidomide/IL-2 probably not represent a promising therapeutic approach for this subgroup of patients, and the clinical benefit are showing to be uncertain [64]. Another study with RCC patients showed that 15% of the patients treated with IL-2 or interferon (IFN)-alpha presented tumor responses. These results confirm the IL-2 treatment as a standar of care in RCC therapy [65].

One of the most active clinically treatments are those that bind to hematologic tumors. Until then, only one agent, with human IL-2 and truncated diphtheria toxin, is

approved for use in cutaneous T-cell lymphoma. Another immunotoxin containing an anti-CD22 Fv and truncated *Pseudomonas* exotoxin was tested in hairy-cell leukemia with success. The development of new immunotoxins is a hope to improve the treatment of cancer in the future [49].

IL-2 predominantly supported MNC functional activity rather than inhibited lymphoid MNC apoptosis in in vitro culture in the presence of cytostatic drugs. In carboplatin- cultured MNC from healthy subjects, IL-2 significantly potentiated their toxicity for tumor cells by generation interferon-gamma [41].

The uses of IL-2 included pancreatic cancer too. Preliminary results of a treatment showed that surgery-induced lymphocytopenia may be abolished by a brief preoperative administration of IL-2: This short-period with IL-2 is sufficient to transform host tumor interactions in operable pancreatic cancer, with a subsequent annulment of postoperative lymphocytopenia and an increase in the survival time of overall [66].

In ovarian cancer, LAK-therapy was used as a component of complex treatment. Roncoleukin-recombinant IL-2 for LAK therapy in ovarian cancer established an autocrine stimulation of IL-2 production, augment in T-cell proliferation, growth of NK-cells cytotoxicity, immediate cytotoxic effect on K562 target cells culture. This effect could increase its susceptibility to NK-lysis [67].

In patients with metastatic melanoma IL-2 is approved for use in the US since 1998. The different way of IL-2 administration can show different responses: a high-dose bolus schedule produces a small number of durable remissions in patients with metastatic melanoma; a continuous infusion either alone or in combination with chemotherapy IL-2 has not increased response rates when compared to chemotherapy

alone. Its important to play attention that in low-doses IL-2 appears to be ineffective in metastatic melanoma [68].

New therapies strategi for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma are constantly emerging. New options under investigation include topical retinoids, fusion molecules like denileukin diftitox, pegylated interferon, IL-12 and IL-2. Other treatments included pegylated liposomal doxorubicin, gemcitabine, and chlorodeoxyadenosine [69].

IL-2 can be used in a lot of different treatments, showing good results. Lymphoid malignancies, for examplo can be treated in a rational therapy combining rexinoids with interleukin-2 receptor-targeted therapies, such as denileukin diftitox [70]. Metastatic renal cell carcinoma that has historically been refractory to cytotoxic and hormonal agents; in a few pacients only IL-2 and interferon alpha provide response [24]. The postherpetic pain was resolved after treatment with 1 cycle of subcutaneous recombinant IL-2 [71].

In HIV-infected patients, the IL-2/IL-2 receptor (IL-2R) system is deregulated. Some HIV patients have IL-2R defects that persist along the infection and the CD4 counts remain low despite good control of the viral load. These patients benefit with IL-2 therapy, because IL-2 is under produced along with defective IL-2R signaling detected in patient lymphocytes. These results may explain the progressive impairment of the immune system that occurs during chronic infection with this virus. These defects are partly reversed by highly active antiretroviral therapy [11].

The effects of treatment with IL-2 in NOD mice can vary widely depending on factors like the dosing, regimen, amount of endogenous IL-2. The number of activated CD4 and CD8 T cells, NK cells, and Treg cells in the host also can influenciated the

responses to IL-2 [72]. For the treatment of autoimmune diseases, immune stimulation rather than immunosuppression may be an effective strategy [17].

The administration of anti-CD3 and IL-2 that have been investigated in many types of human cancers. T cells can be activated in vitro by monoclonal antibodies to CD3 (anti-CD3) to become non-MHC restricted killer cells increasing the expression of IL-2 receptors on T cells, by the end, these expansion is facilitated by IL-2 [73]. However, with IL-2, either the CTLs generated can recognize the tumor as self and undergo AICD or can the immune response be inhibited by IL-2-dependent Treg cells [74].

## **8. IL-2 as a marker of disease activity**

IL-2R $\alpha$ , has been a great valuable target for immunotherapy. IL-2R $\alpha$  is just expressed in Treg cells and is constitutively expressed by malignant cells of various T- and B-cell leukemia [75]. The therapy in these cases involves antibodies specific for IL-2R $\alpha$  for example, basiliximab, and daclizumab. These antibodies block the interaction of IL-2 with IL-2R, taking to cytokine deprivation and cell death for IL-2-dependent cells. The FDA approved these antibodies associated with conventional immunosuppression for renal transplant rejection episodes [76,77,78].

Soluble IL-2 receptor (sIL-2R or sCD25) is typically elevated in hemophagocytic lymphohistiocytosis, a severe inflammatory disorder marked by abnormal activity of cytotoxic T and natural killer cells, these patients have excessive cytokine production, and continued immune system activation. So, sIL-2R can serve as a marker of this disease activity, although the role of IL-2 in the pathophysiology of the disease is not clear [79].

The concentrations of sIL-2R can be a useful diagnosis tool, sIL-2R concentrations in serum of sarcoidosis patients were found to be significantly higher than in healthy controls. Chitotriosidase and sIL-2R are two markers of sarcoidosis of different origin, the values of which show a correlation in these patients; they are easily detectable in serum [80].

Serum soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) serves as a marker of disease activity in patients with tuberculosis (TB). However, little is known about its role in latent TB. Comparison of the two groups showed a significantly higher serum sIL-2R level in the patients. Mean sIL-2R levels were significantly correlated with the presence of latent TB and with purified protein derivative subgroups sIL-2R assay may serve as an additional tool to estimate the extent of the immune response in patients with latent TB [81].

## **9. IL-2 for vaccine development**

The model of cytokine expression by vaccine-induced HIV-specific T cells presents a diminished frequency of interferon- $\gamma$  producing T cells and an increased of IL-2-producing T cells. The DNA vaccination is a potential AIDS vaccine; it induced antibody to and T cell responses against 3 major HIV-1 subtypes [82]. Other vaccine could increased frequency of IL-2 producing T-cells in a exposure to a DNA vaccine HIV-specific, inducing antibodies to and T cell responses against 3 major HIV-1 subtypes too [24].

A polyvalent Melanoma Vaccine (DC-MelVac; Patent #11221/5) developed for Melanoma-Associated Antigens consists of a recombinant IL-2 gene-encoded vaccine melanoma oncolysate (rIL-2VMO) derived from an established human melanoma cell line [83]. Patients with metastatic melanoma can be benefitted with dendritoma

vaccines with a low dose of IL-2 that can be safely administered and induce immunological and clinical responses [84].

## **Conclusions**

The elucidation of the physiological behavior of cytokines, including IL-2, in many diseases reflects a complex network of interactions. New treatments through immunomodulation and vaccines may be the hope of treatment in diseases like cancer, AIDS and diabetes. It should be now evaluate these new therapeutic strategies, their results, the risk for the patient and the combination therapies. The challenge now is to adaptive the knowledge about IL-2 to each patient, according to its immune condition, increasing the quality of life and maybe someday their cure. This is certainly a great incentive to develop new researches based on the promising preliminary results, or even consolidate the already well established therapeutic strategies using IL-2.

## References

- [1] Bunting K, Wang J, Shannon MF. Control of interleukin-2 gene transcription: a paradigm for inducible, tissue-specific gene expression. *Vitam Horm* 2006;74:105-45.
- [2] Waldmann, TA, Dubois S, Tagaya, Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001;14:105–110.
- [3] Marks-Konczalik J, Dubois S, Losi JM, Sabzevari H, Yamada N, Feigenbaum L, *et al.* IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; Oct 10;97(21):11445-50.
- [4] Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 2001; Dec;1(3):200-8.
- [5] Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006;24:657-79.
- [6] Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the  $\gamma$ c-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* 2004;202:67–83.
- [7] Smith KA. The *Quantal Theory* of how the immune system discriminates between "self and non-self". *Med Immunol* 2004; Dec 17;3(1):3.
- [8] Fehniger, TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14–32.
- [9] Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, *et al.* The interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev Immunol* 1996;14:179–205.



- [10] Miyazaki T, Liu ZT, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, *et al.* Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 1995; 81:223–231.
- [11] Kryworuchko M., Theze J. Interleukin-2: from T cell growth and homeostasis to immune reconstitution of HIV patients. *Vitam Horm* 2006;74:531-47.
- [12] Pandiyan P, Hegel JK, Krueger M, Quandt D, Brunner-Weinzier MC. High IFN-gamma production of individual CD8 T lymphocytes is controlled by CD152 (CTLA-4). *J Immunol* 2007; Feb 15;178(4):2132-40.
- [13] Kikkawa E, Yamashita M, Kimura M, Omori M, Sugaya K, Shimizu C, *et al.*, T(h)1/T(h)2 cell differentiation of developing CD4 single-positive thymocytes. *Int Immunol* 2002; Aug;14(8):943-51.
- [14] Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84:973-980.
- [15] Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, SurhCD, Malek TR.. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2008; 181(1):225-34.
- [16] Shi MQ, Hirzmann J, Dafa'alla TH, Zahner H. *In vivo* expression profiles of cytokine and iNOS mRNAs in rats infected with *Eimeria separata*. *Vet Parasitol* 2001; May 22;97(2):131-40.
- [17] Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, *et al.*, Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 2008; May;28(5):687-97.
- [18] Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988; May 27;240(4856):1169-76.

- [19] Smith KA. The structure of IL2 bound to the three chains of the IL2 receptor and how signaling occurs. *Med Immunol* 2006; Aug 14;5:3.
- [20] Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101:455–58.
- [21] Hori H, Yoshimura R, Yamada Y, Ikenouchi A, Mitoma M, Ida Y, Nakamura J. Effects of olanzapine on plasma levels of catecholamine metabolites, cytokines, and brain-derived neurotrophic factor in schizophrenic patients. *Int Clin Psychopharmacol* 2007; Jan;22(1):21-7.
- [22] Yao Z, Kanno Y, Kerényi M, Stephens G, Durant L, Watford WT *et al.*, Nonredundant roles for Stat5a. *Blood* 2007; May 15;109(10):4368-75.
- [23]. Aarts-Rimens T, Emmelot ME, Verdonck LF, Mutis T. Forced overexpression of either of the two common human Foxp3 isoforms can induce regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells. *Eur J Immunol.* 2008; May;38(5):1381-90.
- [24] Jaalouk DE, Lejeune L, Couture C, Galipeau J. A self-inactivating retrovector incorporating the IL-2 promoter for activation-induced transgene expression in genetically engineered T-cells. *Virology* 2006;3:97.
- [25] Bandyopadhyay S, Dure M, Paroder M, Soto-Nieves N, Puga I, Macian F. Interleukin 2 gene transcription is regulated by Ikaros-induced changes in histone acetylation in anergic T cells. *Blood* 2006; Dec 5.
- [26] Wang HJ, Shao JZ, Xiang LX, Shen J. Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of an ILF2 Homologue from *Tetraodon nigroviridis*. *J Biochem Mol Biol* 2006; Nov 30;39(6):686-95.
- [27] Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH. Correction of interleukin-2 gene expression by in vitro zinc addition to mononuclear cells from zinc-deficient human

subjects: a specific test for zinc deficiency in humans. *Transl Res* 2006; Dec;148(6):325-33.

[28] Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, Yang GX, *et al.*, IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006; Nov;44(5):1240-9.

[29] Fearon DT, Carr JM, Telaranta A, Carrasco MJ, Thaventhiran JE. The rationale for the IL-2-independent generation of the self-renewing central memory CD8+ T cells. *Immunol Rev* 2006; Jun;211:104-18.

[30] Wang X, Rickert M, Garcia KC. Structure of the Quaternary Complex of Interleukin-2 with Its {alpha}, {beta}, and {gamma}c. Receptors 2005; Nov 18;310(5751):1159-1163.

[31] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008; Sep;118(9):3132-42.

[32] Sogo T, Kawahara M, Tsumoto K, Kumagai I, Ueda H, Nagamune T. Selective expansion of genetically modified T cells. *J Immunol Methods* 2008; Aug 20;337(1):16-23.

[33] Wu HC, Chang CH, Wan L, Wu CI, Tsai FJ, Chen WC. IL-2 gene C/T polymorphism is associated with prostate cancer. *J Clin Lab Anal* 2006;20(6):245-9.

[34] Averil MA, Koka R, Burkett P, Diverse Functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in Lymphoid Homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:657-679.

[35] Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:114-30.

- [36] Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, *et al.*, Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; Aug;212:8-27.
- [37] D'Souza WN, Lefrancois L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 2003;171:5727–35.
- [38] D'Souza WN, Schluns KS, Masopust D, Lefrancois L.. Essential role for IL-2 in the regulation of antiviral extralymphoid CD8 T cell responses. *J Immunol* 2002; 168:5566–72.
- [39] Seharawat S, Suvas S, Sarangi PP, Suryawanshi A, Rose BT. *In vitro*-generated antigen-specific CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells control the severity of herpes simplex virus-induced ocular immunoinflammatory lesions. *J Virol.* 2008; Jul;82(14):6838-51.
- [40] Pawlaczyk M, Sobieska M. A correlation between acute phase proteins and cytokines in patients suffering from mycosis fungoides. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2006; Sep;15(3):107-12.
- [41] Potapnev MP, Vashkevich EP, Savitskii VP, Belevtsev MV, Ismail-zade RS, Konoplia NE. Effect of interleukin-2 on apoptosis and function of human lymphocytes in in-vitro cytostatics culture. *Vopr Onkol.* 2005;51(6):697-702.
- [42] Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. The crucial role of IL-2/IL-2RA-mediated immune regulation in the pathogenesis of type 1 diabetes, an evidence coming from genetic and animal model studies. *Immunol Lett.* 2008 Jun 15;118(1):1-5.
- [43] Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211:236-54

- [44] Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity Trends Immunol. 2006 Mar;27(3):109-11.
- [45] Katsiari CG, Tsokos GC Transcriptional repression of interleukin-2 in human systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev. 2006 Feb;5(2):118-21.
- [46] Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nat Rev Immunol. 2006 Aug;6(8):595-601
- [47] Kreitman RJ .Immunotoxins for targeted cancer therapy. 1: AAPS J. 2006 Aug 18;8(3):E532-51
- [48] Thippawong J. Inhaled cytokines and cytokine antagonists.: Adv Drug Deliv Rev. 2006 Oct 31;58(9-10):1089-105.
- [49] Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins in the treatment of hematologic malignancies.Curr Drug Targets. 2006 Oct;7(10):1301-11.
- [50] Wei S, Kryczek I, Edwards RP, Zou L, Szeliga W, Barnerjee M, Cost M, Cheng P, Chang A, Redman B, Herberman RB, Zou W. Interleukin-2 administration alters the CD4+FOXP3+ T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma. Cancer Res. 2007 Aug 1;67(15):7487-94.
- [51] Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. Immunity 2000; Apr;12(4):431-40.
- [52] Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroundis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. Immunity. 2008 May;28(5):687-97.
- [53]Jeal H. Isolation, flow cytometric analysis, and suppression assay of CD4+ CD25+ T-regulatory cells. Methods Mol. Med. 2008;138:85-96

- [54] Doganci A, Karwot R, Maxeiner JH, Scholtes P, Schmitt E, Neurath MF, Lehr HA, Ho IC, Finotto S. IL-2 receptor beta-chain signaling controls immunosuppressive CD4+ T cells in the draining lymph nodes and lung during allergic airway inflammation in vivo. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):1917-26
- [55] Quan WD Jr, Walker PR, Quan FM, Ramirez M, Elsamaloty HM, Ghai V, Vinogradov M, Liles DK. Activity of continuous infusion plus pulse interleukin-2 with famotidine in patients with metastatic kidney cancer or melanoma previously treated with interleukin-2. *Cancer Biother Radiopharm.* 2006 Oct;21(5):437-42.
- [56] Rosenberg, S. A. Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J. Sci. Am.* 2000; Feb;6 Suppl 1:S2-7.
- [57] Rosenberg, S. A. *et al.* Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2. *JAMA* 1994; 271: 907–913.
- [58] Oya M. Treatment of renal cell carcinoma with interferons *Nippon Rinsho.* 2006 Jul;64(7):1281-5.
- [59] Yang H, Liu S, Liang C, Peng W. . Studies of mouse interleukin-2 gene therapy for head, and neck squamous cell carcinoma using polycationic liposome-mediated transduction. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2003 Jan;34(1):9-11, 30.
- [60] Holmberg LA, Maloney D, Bensinger W. Immunotherapy with rituximab/interleukin-2 after autologous stem cell transplantation as treatment for CD20+ non-Hodgkin's lymphoma **1**: *Clin Lymphoma Myeloma.* 2006 Sep;7(2):135-9.
- [61] Quan WD Jr, Vinogradov M, Quan FM, Khan N, Liles DK, Walker PR. Continuous infusion interleukin-2 and famotidine in metastatic kidney cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* 2006 Oct;21(5):515-9.

- [62] Alexandrescu DT, Dasanu CA. Kidney cancer therapy: new perspectives and avenues. *Expert Opin Pharmacother*. 2006 Dec;7(18):2481-2493.
- [63] Savas B, Kerr PE, Pross HF. Lymphokine-activated killer cell susceptibility and adhesion molecule expression of multidrug resistant breast carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2006 Nov 3;6:24.
- [64] Schrader AJ, Heidenreich A, Hegele A, Olbert P, Varga Z, Hofmann R. Second-Line Thalidomide/IL-2 Therapy in Metastatic Kidney Cancer - Results of a Pilot Study. *Aktuelle Urol*. 2006 Nov;37(6):429-435.
- [65] Hutson TE, Quinn DI. Cytokine therapy: a standard of care for metastatic renal cell carcinoma? *Clin Genitourin Cancer*. 2005 Dec;4(3):181-6 Comment in: *Clin Genitourin Cancer* 2005; Dec;4(3):155.
- [66] Caprotti R, Brivio F, Fumagalli L, Nobili C, Degrate L, Lissoni P, *et al*. Free-from-progression period and overall short preoperative immunotherapy with IL-2 increases the survival of pancreatic cancer patients treated with macroscopically radical surgery. *Anticancer Res* 2008; May-Jun;28(3B):1951-4.
- [67] Zlatnik Elu, Golotina Llu. The use of roncoleukin for LAK therapy in ovarian cancer. *Vopr Onkol*. 2005;51(6):680-4.
- [68] Tarhini AA, Agarwala SS. Interleukin-2 for the treatment of melanoma. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005 Dec;6(12):1234-9.
- [69] Dummer R. Future perspectives in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Semin Oncol*. 2006 Feb;33(1 Suppl 3):S33-6.
- [70] Foss F. Clinical experience with denileukin diftitox (ONTAK). *Semin Oncol*. 2006 Feb;33(1 Suppl 3):S11-6.

- [71] Rotty J, Heinzerling L, Schurmann D, Sutorp N. Interleukin-2: a potential treatment option for postherpetic neuralgia? *Clin Infect Dis*. 2006 Dec 15;43(12):e109-10.
- [72] Chatenoud L CD3 antibody treatment stimulates the functional capability of regulatory T cells. *Novartis Found Symp*. 2003;252:279-86; discussion 286-90.
- [73] Lee KD, Chen HW, Chen CC, Shih YC, Liu HK, Cheng ML. Construction and characterization of a novel fusion protein consisting of anti-CD3 antibody fused to recombinant interleukin-2. *Oncol Rep*. 2006 May;15(5):1211-6.
- [74] Wei CH, Yagita H, Masucci MG, Levitsky V. Different programs of activation-induced cell death are triggered in mature activated CTL by immunogenic and partially agonistic peptide ligands. *J Immunol*. 2001; Jan 15;166(2):989-95.
- [75] Waldmann, T A. The interleukin-2 receptor. *J. Biol. Chem*.1991; 266, 2681–2684.
- [76] Kirkman, RL. *et al*. A randomized prospective trial of anti-Tac monoclonal antibody in human renal transplantation. *Transplantation* 1991; 51: 107–113.
- [77] Vincenti, F. *et al*. Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med* 1998; 338:161–165.
- [78] Nashan, B. *et al*. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group. *Lancet* 1997; 350:1193–1198.
- [79] Olin RL, Nichols KE, Naghashpour M, Wasik M, Shelly B, Stadtmauer EA, Vogl DT. Successful use of the anti-CD25 antibody daclizumab in an adult patient with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol*. 2008 Sep;83(9):747-9.



- [80] Bargagli E, Bianchi N, Margollicci M, Olivieiri C, Luddi A, Coviello G, Grosso S, Rottoli P. Chitotriosidase and soluble IL-2 receptor: comparison of two markers of sarcoidosis severity. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008 Feb 11:1-5.
- [81] Shitrit D, Izbicki G, Shitrit AB, Raz M, Sulkes J, Kramer MR. Role of soluble interleukin-2 receptor levels in patients with latent tuberculosis. *Lung*. 2006 Jan-Feb;184(1):21-4.
- [82] Graham BS, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, *et al.*, Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 DNA Candidate Vaccine *J Infect Dis*. 2006 Dec 15;194(12):1650-60.
- [83] Aydin N, Jack A, Montenegro G, Boyes C, Alam K, Wallack MK. Expression of Melanoma-Associated Antigens in Human Dendritic Cells Pulsed with an Interleukin-2 Gene Encoded Vaccinia Melanoma Oncolysate (rIL-2VMO). *Cancer Biol Ther*. 2006 Dec;5(12):1654-7.
- [84] Wei Y, Sticca RP, Holmes LM, Burgin KE, Li J, Williamson J, *et al.* Dendritoma vaccination combined with low dose interleukin-2 in metastatic melanoma patients induced immunological and clinical responses. *Int J Oncol*. 2006 Mar;28(3):585-93.

**Table 1.** Roles of the most relevant cytokines in vivo

<b>Cytokines</b>	<b>Primary actions</b>
IL-1 $\beta$	Endogenous pyrogen, Induces adhesion molecule (ICAM) expression Proinflammatory
IL-2	Induces proliferation of LAK cells (lymphokites activated killer) Growth factor for T lymphocytes and NK
IL-6	Can be both pro and anti-inflammatory Endogenous pyrogen, Mediates hepatic acute phase response Index for magnitude of systemic inflammation
IL-7	Maturation of T, B cells Proliferation of CTL and LAK
IL-8	Recruits and activates neutrophils Index for magnitude of systemic inflammation
IL-10	Anti-inflammatory via inhibition of TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$ production and NF-kB translocation
IL-11	Anti-inflammatory via inhibition of TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ production endothelial cells Hematopoietic growth factor Induces hepatic acute phase response
IL-12	Proinflammatory via induction of TNF- $\alpha$ and interferon $\gamma$ neutrophils Synergistic with IL-18 Induces differentiation of TH1 cells Activates neutrophils
IL-13	Anti-inflammatory activity Growth/differentiation of B lymphocytes
IL-15	Proliferation and differentiation of B lymphocytes Promotion of angiogenesis Induction of LAK in NK cells
IL-18	Proinflammatory Synergizes with IL-12 to induces interferon- $\gamma$ Synergizes with IL-1 $\beta$ to cause myocardial depression

**Table 2.** Immunomodulatory and immunostimulatory IL-2 functions in vivo.

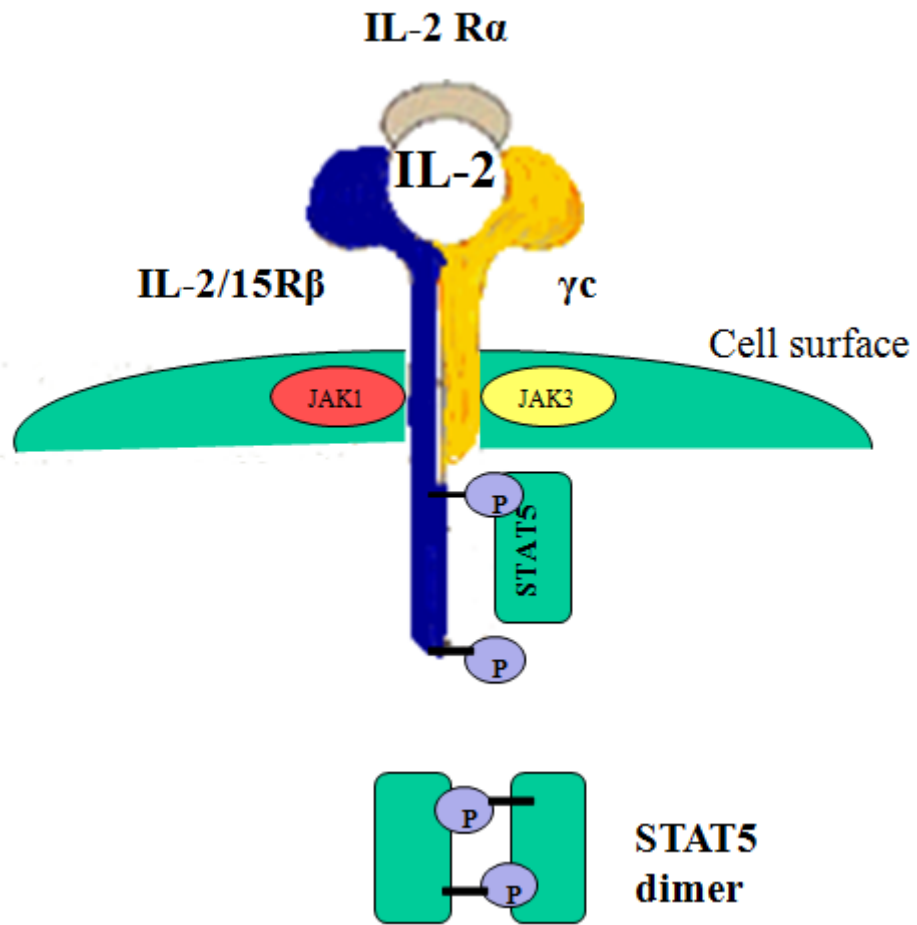
<b>Immunoregulatory</b>	<b>Immunostimulatory</b>
Maintenance of self tolerance T reg cells	T cell differentiation
Promotes AICD	Development of memory Maintenance of T cells in chronic infections Effector T cells in non-lymphoid tissues

## **Figure Legends**

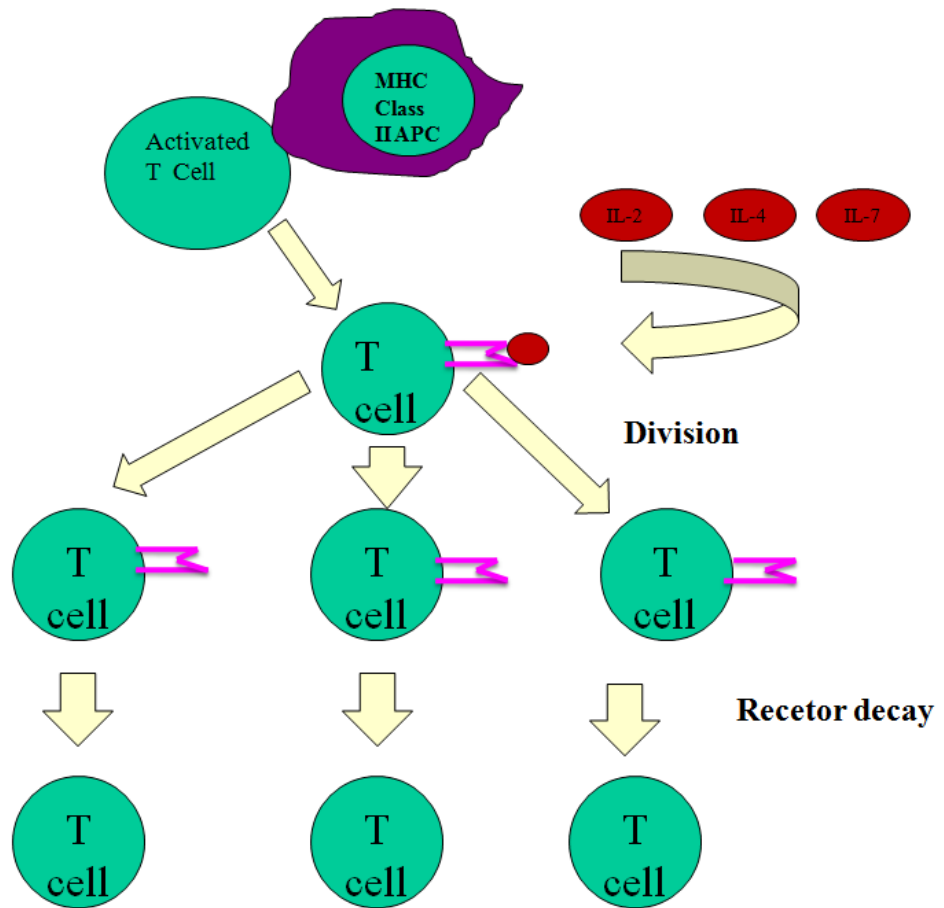
**Figure 1. Interleukin-2 receptor.** Interleukin-2 receptor (IL-2R) and interleukin 15 receptor (IL-15R) contain the same  $\beta$  and  $\gamma$  subunits, signal transduction mediated by IL-2 and IL-15 involves common JAK (Janus kinase) JAK1 (Janus kinase 1) and JAK3 (Janus kinase 3) and STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) signalling molecules. These interaction leads to phosphorylation of the JAK1 and JAK3 kinases , STAT5 associates with the phosphorylated receptor and is phosphorylated too, what results in the STAT5 dimerization , that is translocated to the nucleus and so promote the transcription of target genes.

**Figure 2. Physiological action of IL-2 in the activation of T cells.** Activation of T cells results in the formation of high affinity IL-2 receptors and induction of the synthesis and secretion of IL-2 and IL-4. These bind to their receptors and the cells proliferate. When stimulation by interleukins (paracrine or autocrine) declines, receptors decay and the proliferative phase is end.

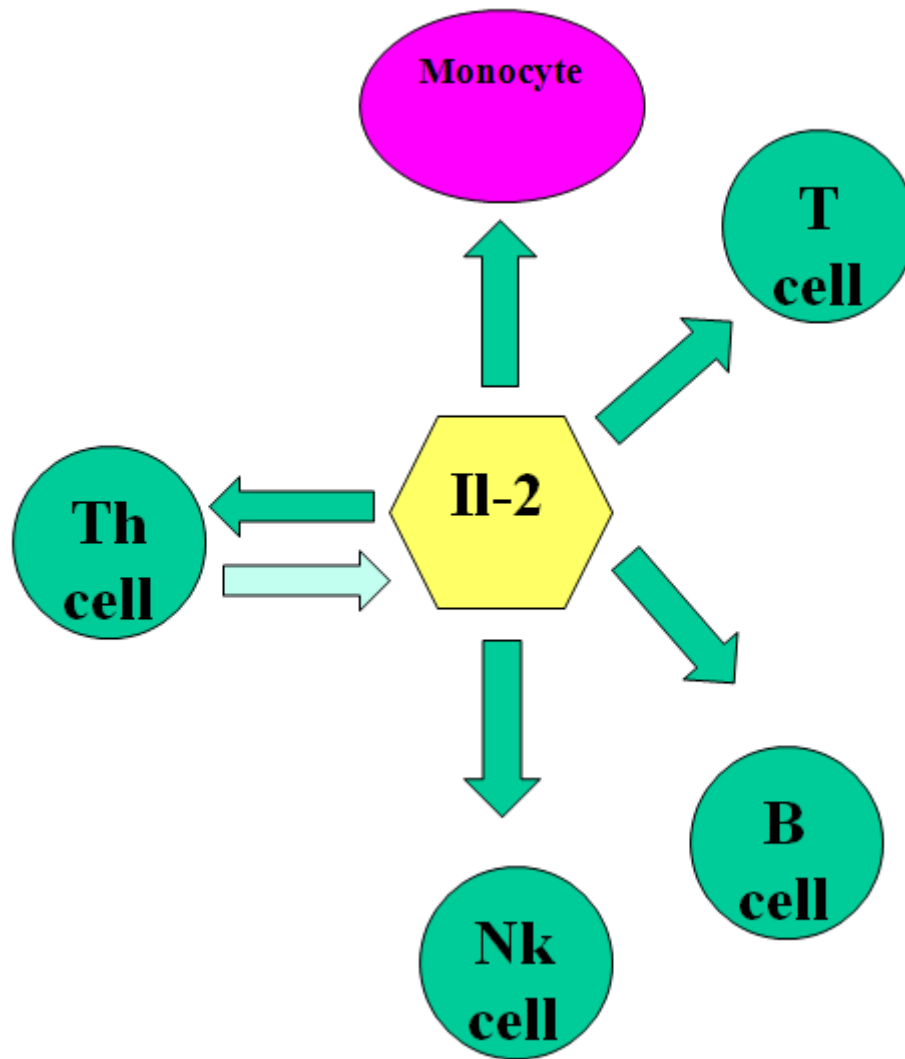
**Figure 3. Immune-regulatory actions of interleukin-2.** Stimulation of B cell and T cell division and IFN gamma release and other mediators, increase in NK Cell activity and monocyte activatio



- **Figure 1. Interleukin-2 receptor**



- **Figure 2. Physiological action of IL-2 in the activation of T cells.**



- 
- **Figure 3. Immune-regulatory actions of interleukin-2.**

## REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- Abranches, J., Morais, P. B., Rosa, C. A., Mendonça-Hagler, C., Hagler, A. N. (1997). The incidence of “killer” activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can. J. Microbiol.* 43: 328-336.
- Arya, R.; Aslam, S.; Gupta, S.; Bora, R. S.; Vijayakrishnan, L.; Gulati, P.; Naithani, S.; Mukherjee, S.; Dastidar, S.; Bhattacharya, A.; Saini, K. S. (2008). Production and characterization of pharmacologically active recombinant human phosphodiesterase 4B in *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol J.*, 3(7):938-47.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J.A., Struhl, K. *Current protocols in molecular biology*. New York: 1987 John Wiley and Sons.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* Oct;10(5):411-21.
- Bevan, E.A., Makower, M. (1963). The physiological basis of the “killer”- character in yeast. *Proc. Int. Congr. Genet.* 11203.
- Bostian, K. A., Elliott, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., Tipper, D. J. (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* 36: 741-751.
- Buzzini, P., Martini, A. (2001). Large –scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. *Med. Mycol.* 39, 479 482.
- Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. (2000): Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.*, Jan;24(1):45-66.



Dinman, J. D.; Icho, T.; Wickner, R. B. (1991). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 174–178.

Esteban, R.; Fujimura, T.; Wickner, R. B. (1988). Site specific binding of viral plus single-stranded RNA to replicase-containing open virus-like particles of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jun;85(12):4411-5.

Fujimura, T.; Ribas, J. C.; Makhov, A. M.; Wickner, R. B. (1992). Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. *Nature* 359:746–749.

Fujimura, T.; Wickner, R. B. (1988). Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. In vitro conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form. *J Biol Chem.*, Jan 5;263(1):454-60.

Gellissen, G., Hollenberg, C. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene* 190: 87-97.

Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F., Sakaguchi, K. (1981). Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. Bacteriol.* 145: 382-390.

Hamilton, S. R.; Davidson, R. C.; Sethuraman, N.; Nett, J. H.; Jiang, Y.; Rios, S.; Bobrowicz, P.; Stadheim, T. A.; Li, H.; Choi, B. K.; Hopkins, D.; Wischnewski, H.; Roser, J.; Mitchell, T.; Strawbridge, R. R.; Hoopes, J.; Wildt, S.; Gerngross, T. U. (2006). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science.*, Sep 8;313(5792):1441-3.

Heintel, T., Zagorc, T., Schmitt, M. J. (2001). Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 165-172.

- Hopper, J. E.; Bostian, K. A.; Rowe, L. B.; Tipper, D. J.; (1977). Translation of the L-species dsRNA genome of the killer-associated virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 252:9010-9017.
- Houard, S., Heinderyckx, M., Bollen, A. (2002). Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera. Biochimie 84:1089–1093.
- Huang, D.; Gore, P. R.; Shusta, E. V. (2008). Increasing yeast secretion of heterologous proteins by regulating expression rates and post-secretory loss. Biotechnol Bioeng., Jun 11.
- Icho, T.; Wickner, R. B. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. J Biol Chem., Apr 25;264(12):6716-23.
- Kirnbauer, R.; Booy, F.; Cheng, N.; Lowy, D. R.; Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc Natl Acad Sci USA 89: 12180–12184.
- Kruger, D. H.; Ulrich, R.; Gerlich, W. H. (1999). Chimeric virus-like particles as vaccines. Biol Chem., 380: 275–276.
- Latham, P. W. (1999). Therapeutic peptides revisited. Nat Biotechnol. Aug;17(8):755-7.
- Lico, C.; Chen, Q.; Santi, L. (2008). Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. J Cell Physiol., 216(2):366-77.
- Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast., Mar;22(4):249-70.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev.* Jul;10(3):369-400.

Masison, D. C.; Blanc, A.; Ribas, J. C.; Carroll, K.; Sonenberg, N.; Wickner, R. B. (1995). Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Mol Cell Biol.*, May;15(5):2763-71.

Maya, D.; Quintero, M. J.; de la Cruz Muñoz-Centeno, M.; Chávez, S. (2008). Systems for applied gene control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.*, Jun;30(6):979-87.

Meinhardt, F., Kempken, F., Kamper, J. and Esser, K. (1990). Linear plasmids among eucaryotes: fundamentals and application. *Curr.Genet.*17,89-95.

Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000 64: 34–50.

Pfeifer, B.A., Khosla, C. (2001). Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar;65(1):106-18.

Pfeiffer, P.; Radler, F.; Caspritz, G.; Hänel, H.; (1988). Effect of a Killer Toxin of Yeast on Eucaryotic Systems. *Appl Environ Microbiol.*, Apr;54(4):1068-1069.

Porro, D.; Mattanovich, D. (2004). Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol.*, 267:241-58.

Ribas, J. C., Wickner, R. B. (1998). The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, Apr 10;273(15):9306-11.

Russel, P. J., Hambidge, S. J., Kirkegaard, K. (1991) Direct introduction and transient expression of capped and non-capped RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 19:4949-4953.

Schmitt, M. J., Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.*, Aug;26(3):257-76.

Smith, J. L.; Kupchak, B. R.; Garitaonandia, I.; Hoang, L. K.; Maina, A. S.; Regalla, L. M.; Lyons, T. J. (2008). Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids.*, Oct;73(11):1160-73.

Srivastava, R.; Lal, S.K. (2003): A yeast assay for high throughput screening of natural anti-viral agents. *Biochem Biophys Res Commun.*, Jan 31;301(1):218-21.

Suzuki, C., Nikkuni, S. (1994) The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J. Biol. Chem.* 269: 3041-3046.

Ulmer, J. B.; Valley, U.; Rappuoli, R. (2006). Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol* 24: 1377–1383.

Valenzuela, P.; Medina, A.; Rutter, W. J.; Ammerer, G.; Hall, B. D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298:347–350.

Vondrejs, V.; Psenicka, I.; Kupcová, L.; Dostálová, R.; Janderová, B.; Bendová, O. (1983). The use of a killer factor in the selection of hybrid yeast strains. *Folia Biol (Praha).*, 29(5):372-84.

Wentz, A. E.; Shusta, E. V. (2008). Enhanced secretion of heterologous proteins from yeast by overexpression of ribosomal subunit RPP0 *Biotechnol Prog.*, May-Jun;24(3):748-56.

Wickner, R. B. (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.*, 60: 250–265.

Wickner, R. B. (1992). Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol.* 46:347-75.

Worsham, P. L., Bolen, P. L. (1990) Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr. Genet.* 18: 77-80.

Young, T. W., Yagiu, M. (1978) A comparison of the “killer” character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek* 44: 59-77.