

Trabajos originales

Producción de un polipéptido con actividad antiviral por fusión del gen Interferón- α_2 humano al gen *lacZ* del bacteriófago M13mp8

C. D. DENOYA*, A. R. TREVISAN, A. PESCE, M. CRISCUOLO, J. ZORZOPULOS, A. DÍAZ

Instituto Sidus S. A., Area de Biotecnología, Larrea 926,

1.117 - Buenos Aires, Argentina

Recibido el 15 de julio de 1984

RESUMEN

Un gen de IFN- α_2 recientemente aislado en nuestro laboratorio a partir de una librería de ADN cromosomal humano, fue genéticamente manipulado *in vitro* para poder acortar la secuencia señal y mejorar el rendimiento de IFN en cultivos bacterianos. Primero, la secuencia señal fue acortada en una extensión equivalente a nueve codones, usando la enzima de restricción *HaeIII* y la secuencia remanente fue fusionada en fase con el codón iniciador del gen *lacZ* presente en el bacteriófago M13mp8. Uno de los clones recombinantes fue analizado en detalle. Este clon mostró una alta inestabilidad del inserto y una baja producción de actividad IFN, con un rendimiento similar al obtenido con el gen pre-IFN- α_2 completo. El gen fusionado *lacZ*/IFN- α_2 fue entonces transferido por clonaje molecular al plásmido pBR322.

Uno de los clones obtenidos mostró una buena estabilidad del plásmido híbrido, y aunque el rendimiento de actividad de IFN fue bajo (3×10^5 unidades/ml de extracto bacteriano crudo) la producción se mantuvo aún después de más de 20 pases. Finalmente, la secuencia señal recombinante presente en este clon fue nuevamente acortada en una extensión equivalente a 7 codones y se encontró que uno de los nuevos clones incrementaba aproximadamente en 20 veces el nivel de producción de actividad IFN.

A pesar de que el polipéptido sintetizado constituye un producto de fusión, la actividad biológica antiviral de el IFN parece quedar conservada.

SUMMARY

An Interferon (IFN)- α_2 gene, recently isolated in our laboratory from a human chromosomal DNA library, was genetically manipulated *in vitro* in order to shorten the signal sequence and to improve the yield of IFN in bacterial cultures. First, the signal sequence was shortened in an extension equivalent to nine codons using the *HaeIII* restriction enzyme, and the remnant sequence was fused in phase with the initiator codon of the *lacZ* gene present in bacteriophage M13mp8. One of the recombinant clones was analyzed in

detail. This clone showed a high instability of the insert, and a low production of IFN activity, with a yield similar to that obtained with the complete pre-IFN- α_2 gene. The fused gene *lacZ*/IFN- α_2 was then transferred by molecular cloning to the plasmid pBR322.

One of the clones obtained showed a good stability of the hybrid plasmid and even though the yield of IFN activity was low (3×10^5 units/ml of crude bacterial extract), the production was maintained even after more than 20 passages. Finally, the recombinant signal sequence present in this clone was again shortened in an extension equivalent to 7 codons, and one of the new clones was found to increase approximately 20 times the level of production of IFN activity.

Despite the fact that the synthesized polypeptide constitutes a fused product, the biological antiviral activity of the IFN seems to remain conserved.

INTRODUCCION

Los interferones humanos se clasifican en tres tipos: *alpha* (leucocitario y linfoblastoideo), *beta* (fibroblástico), y *gamma* (inmune). En su conjunto constituyen un sistema que induce un estado antiviral en células animales susceptibles, inhiben la proliferación celular, y modulan la respuesta inmune (Stewart, 1979; Pestka, 1983). Los interferones presentan promisorias aplicaciones clínicas, si bien el elevado costo y las limitaciones de su producción, a partir de cultivos celulares, han impedido hasta el presente su aplicación masiva.

Nuestro laboratorio ha clonado recientemente en *Escherichia coli* un fragmento de cromosoma humano proveniente de una biblioteca de genes preparada en bacteriófago *lambda*, conteniendo la secuencia codificante para el gen del pre-interferón (IFN)-*alpha* 2 completa, de acuerdo con los análisis de restricción efectuados (Denoya et al., sometido a publicación; *Interferon Memoranda* (September 1983) Memo-I-A12104/1). Más, aun este gen fue expresado en *E. coli*, utilizando un plásmido de expresión conteniendo la región promotor-operador del operón *lacUV5* de *E. coli* y una secuencia de Shine-Dalgarno (Backman y Ptashne, 1978), obteniéndose extractos con una actividad biológica antiviral de características similares al interferón leucocitario humano.

Este trabajo resume las manipulaciones genéticas efectuadas al gen IFN-*alpha* 2 con la finalidad de aumentar los niveles de producción de esta actividad biológica en *E. coli*. Como es sabido, el gen del pre-IFN-*alpha* 2 consta de una secuencia codificante del péptido señal de 23 aminoácidos, y una secuencia de 165 aminoácidos correspondiente al interferón leucocitario humano maduro (Goeddel et al., 1981). El procedimiento empleado en este trabajo consistió en la remoción de fragmentos de diversa longitud de la secuencia señal y la subsiguiente fusión de las secuencias restantes del gen en fase al codón de iniciación de traducción del gen *lacZ* del bacteriófago M13mp8.

MATERIALES Y METODOS

Bacterias y plásmidos

E. coli híbrida K-12xB cepa HB101 (Boyer y Roullan-Dussoix, 1969) se usó como huésped en los experimentos de transformación. *E. coli* cepa JM101 (Messing, 1981) se usó como huésped en los experimentos de transfección con el sistema bacteriófago M13mp8. M13mp8

fue obtenido de Bethesda Research Laboratories (BRL) Inc., Maryland, U.S.A. El plásmido pBR322 (Bolívar y Backman, 1979) fue obtenido del Dr. F. Bolívar.

Métodos generales

Las enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, nucleasa S1, y ADN polimerasa I (Fragmento de Klenow), fueron utilizadas según las especificaciones de los fabricantes (PL-Biochemicals o BRL). La reacción de ligación fue realizada en 66 mM Tris-HCl pH 7.6; 6,6 mM MgCl₂; 10 mM DTT, y 1 mM ATP, a 22°C durante toda una noche. La mezcla de ligación se usó en forma directa para los ensayos de transfección o de transformación.

El ADN plasmídico se preparó según lo descrito previamente (Trevisan *et al.*, 1984; Zorzopulos *et al.*, 1984). Cuando se analizó el ADN de simple cadena del bacteriófago M13mp8 y recombinantes, se tomaron 25 µl del sobrenadante de un cultivo fresco del clon analizado, se le adicionaron 7 µl de buffer de muestra (33% glicerol; 7% laurilsulfato de sodio (SDS); 0,07% azul de bromofenol, en buffer de electroforesis (TBE) 1x, la mezcla se calentó 5 minutos a 65°C, y se sembró inmediatamente en un gel de agarosa 0,8%. La electroforesis en geles de agarosa se realizó según lo descrito anteriormente (Schugurensky *et al.*, 1984; Denoya *et al.*, 1981), y en geles de poliácridamida según Maniatis *et al.*, (1982). Fragmentos de ADN fueron aislados de geles de poliácridamida según Maxam y Gilbert (1977), y de geles de agarosa según Thuring *et al.*, (1975).

Todas las manipulaciones genéticas fueron realizadas en condiciones adecuadas de seguridad biológica y física.

Inducción de interferón en clones recombinantes

a) Clones de M13mp8.

Un cultivo fresco de *E. coli* JM101 se diluyó 100 veces en caldo L y se creció 3 h con agitación a 37°C. A ese tiempo, las células se infectaron con una preparación fresca de bacteriófagos recombinantes a una infectividad de 100 ufp por célula. Se incubó 5 min. a 30°C y se diluyó 50 veces con caldo L, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM (IPTG: isopropiltiogalactósido), y se incubó 4 h a 37°C con agitación. Luego se cosecharon 10 ml de este cultivo, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS frío.

b) Clones de pBR322 recombinantes

Los transformantes de *E. coli* fueron crecidos durante la noche a 37°C con agitación en caldo L. A la mañana siguiente el cultivo fue diluido 100 veces en caldo L y se creció durante 2 h más. A ese tiempo, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM, y el cultivo se creció de 2 a 3 h más. Porciones de 10 ml de cada cultivo fueron centrifugadas y las células resuspendidas en 1 ml de PBS frío.

Preparación de extractos bacterianos crudos.

En algunos casos, las células se lisaron por agregado de 100 µl de una solución 10 mg/ml de lisozima, se incubaron en baño de hielo durante 30 min, y se congelaron y descongelaron sucesivamente cuatro veces en forma brusca. Finalmente, las muestras fueron clarificadas por centrifugación durante 10 min a 10 000 x g a 4°C, y los sobrenadantes fueron analizados para determinar su actividad antiviral (ver más adelante). Adicionalmente se analizó el uso de un inhibidor de proteasas como el Fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF) (Sigma P-7626) a una concentración de 1 mM (ver tabla 1). Sin embargo, rutinariamente, los extractos se prepararon

por sonicación (4 pulsos de 10 segundos cada uno, en baño de hielo, utilizando el minitip del sonicador modelo W375 de la Heat Systems Ultrasonics, Inc.), y se clarificaron como se describió anteriormente.

Tabla 1
ACTIVIDAD DE IFN EN CLONES RECOMBINANTES M13mp8/E. COLI

<i>Experimento</i>	<i>Clon</i>	<i>Extracto</i>	<i>Unidades/ml</i>
No. 1 . 3 h post inducción	8PAG	Lisozima	74
post inducción	mp8	Lisozima	26
No. 2 . 4 h sin inducción	8PAG	Lisozima	55
sin inducción	8PAG	Lisoz/PMSF	31
post inducción	8PAG	Lisozima	125
post inducción	8PAG	Lisoz/PMSF	147
post inducción	8PAG	Sonicado	125
post inducción	8PAG	Sonic/PMSF	251
post inducción	8PAG	Sobrenadante	15

Medida de la actividad antiviral

Las muestras fueron analizadas por duplicado en el ensayo de inhibición del efecto citopático, y el contenido de IFN fue estimado relativo a una preparación de referencia del laboratorio, calibrada contra la preparación de Referencia Internacional de IFN leucocitario humano (Standard 69/19) obtenida del Medical Research Council, England. En los ensayos se utilizaron células de amnios humano Wish, y virus de la estomatitis vesicular. Las placas de microtitulación fueron teñidas con cristal violeta según Rubinstein *et al.*, (1981). Los títulos se expresaron en unidades por ml.

RESULTADOS

Clonaje del gen IFN- α 2 en bacteriófago M13mp8

El plásmido p69 (IFN- α 2) es un derivado del vector pBR322 que contiene una inserción de aproximadamente 870 pares de bases (pb) a nivel del sitio *Clal*. De acuerdo con los análisis de restricción efectuados (Denoya *et al.*, sometido a publicación), este segmento contiene una secuencia completa correspondiente al gen del pre-IFN- α 2 humano, similar a la clonada y descrita por otros autores (Streuli *et al.*, 1980; Lawn *et al.*, 1981; Dworkin-Rastl *et al.*, 1983). Este gen consta de una secuencia de 165 tripletes, correspondiente al IFN maduro, precedida por una secuencia correspondiente al péptido señal de 23 aminoácidos, presente en el denominado pre-IFN (figura 1). Como se observa en la figura 1, la secuencia de ADN codificante del péptido señal posee dos sitios de restricción característicos, uno para la enzima *HaeIII*, y otro para la enzima *PvuII*. Con la finalidad de analizar la expresión del gen del IFN- α 2 en el sistema del bacteriófago M13mp8, el plásmido p69 fue primeramente digerido con la enzima

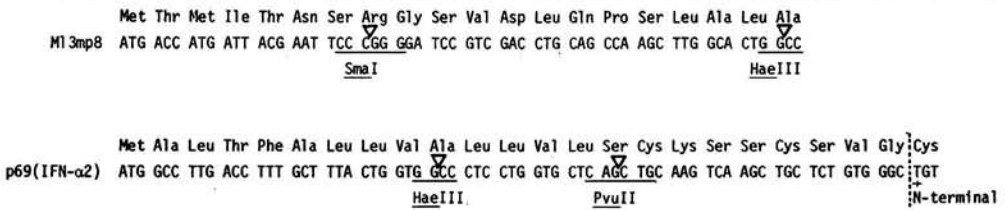


FIG. 1. Sitios de restricción, secuencia de ADN, y secuencia inferida de aminoácidos del gen *lacZ* del M13mp8 y del gen del IFN- α 2.

HaeIII y los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 0,8% (figura 2a). Como se observa en la figura 2a, un fragmento de aproximadamente 1,050 pb es claramente discernible del resto de segmentos menores. Este fragmento corresponde al segmento lindante entre los sitios para la enzima de restricción *HaeIII*, ubicados en la secuencia señal del gen IFN- α 2 y la posición 174 del pBR322 usado como vector originalmente, con la inserción de 870 pb ubicada en el sitio *ClaI* antes mencionada. El segmento de 1,050 pb fue aislado de un gel preparativo hecho en condiciones similares al descrito en la figura 2a, y una alícuota de este material fue analizada para demostrar su grado de pureza y estabilidad (figura 2b).

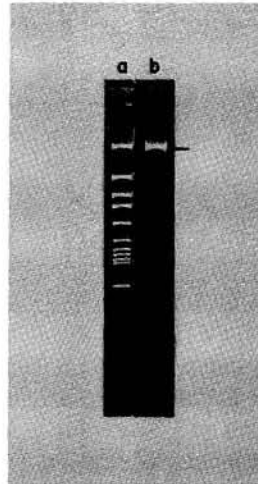


FIG. 2. Análisis de los productos de digestión del plásmido p69 (IFN- α 2) con la enzima *HaeIII*. a. Digestión del p69 con *HaeIII*. b. Análisis del fragmento de 1,050 pb conteniendo el gen del pre-IFN- α 2. El análisis electroforético fue realizado en gels de poliacrilamida 5%. La electroforesis fue de 2 h a 150 V.

El fragmento *HaeIII*-*HaeIII* de 1,020 pb así aislado, fue clonado por ligación de sus terminales romos en el sitio *SmaI* del gen *lacZ* del bacteriófago M13mp8. Como se observa en la figura 1, la secuencia de traducción del gen IFN- α 2 queda así en fase con el codón de iniciación de la *beta*-galactosidasa.

Los productos de ligación se utilizaron para transfectar *E. coli* JM101, obteniéndose 50 colonias blancas. Ocho de las mencionadas colonias se repicaron y el ADN de simple cadena de los recombinantes, presentes en el sobrenadante de cada cultivo, fue analizado por electroforesis

en geles de agarosa (figura 3A). Como se observa en esta figura, cuatro de esos clones poseían un inserto. Uno de esos clones, denominado "8PAG" fue analizado con más detalle. Como se observa en la figura 3B, la forma replicativa (FR) intracelular (ADN de doble cadena) poseía también una movilidad electroforética menor al ser comparada con la FR del M13mp8 original.

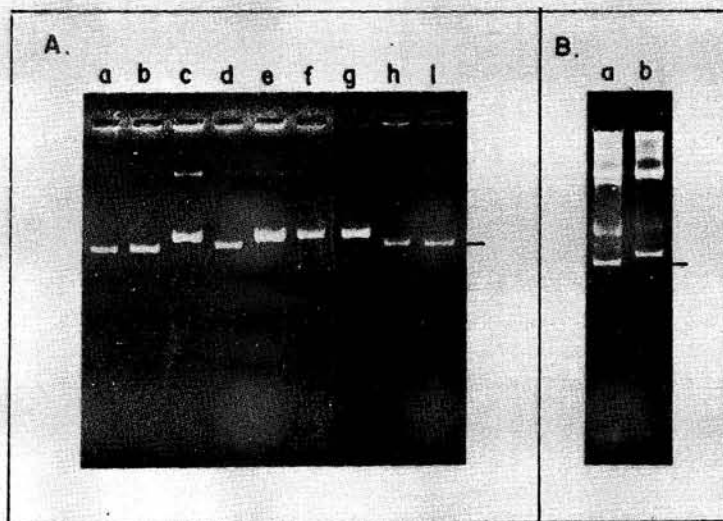


FIG. 3. Análisis de clones recombinantes M13mp8. a. Electroforesis de ADN simple cadena de clones de M13mp8 productores de colonias blancas (a --> h) y un control (colonia azul) (i). b. Análisis de la forma replicativa intracelular de un clon control de M13mp8 (a) y del clon recombinante "8PAG" (b). La electroforesis fue en geles de agarosa 0,8% durante toda una noche a 30 V. La línea al costado de la figura indica la posición del ADN control.

La restricción de la FR del clon 8PAG con la enzima *Hae*III, reveló la aparición de un fragmento de aproximadamente 1,290 pb (figura 4A). Esto es concordante con una inserción de 1,050 pb en el sitio *Sma*I del fragmento de 236 pb de ADN lindante entre los sitios *Hae*III ubicados en las posiciones 6,037 y 6,273 respectivamente del mapa de restricción original del M13mp8 (ver también figuras 4Ab y 5, parte superior). La orientación del inserto fue determinada por una doble restricción con las enzimas *Eco*RI y *Bg*III, y por una restricción simple con la enzima *Pvu*II. La figura 4Bb muestra un fragmento de 246 pb que se extiende desde el sitio *Eco*RI en la posición 6,231 del M13mp8, al primer sitio *Bg*III presente en el gen *IFN-alpha 2*, y un fragmento de 258 pb que se extiende entre los 2 sitios *Bg*III de este gen. A su vez la figura 4Cb muestra un fragmento de 201 pb que se extiende desde el sitio *Pvu*II de la posición 6,053 del M13mp8, al primer sitio *Pvu*II presente en la región codificante del péptido señal del *IFN-alpha 2*, y un fragmento de 304 pb que se extiende entre los dos sitios *Pvu*II de este gen.

Como se observa en el esquema de la figura 5 (parte superior), el gen del IFN insertado está ubicado en la orientación correcta para su expresión bajo el control del sistema promotor/operador del gen *lacZ*. La producción de actividad antiviral en el clon 8PAG fue analizada por inducción con IPTG. Una actividad IFN fue titulable en los lisados bacterianos, observándose valores de 31-55 unidades/ml y 125-251 unidades/ml de extracto crudo, según los cultivos

fuese efectuados en ausencia o en presencia del inductor respectivamente (tabla 1). Esta actividad biológica fue solo recuperable intracelularmente, no detectándose actividad de IFN en el medio extracelular (tabla 1).

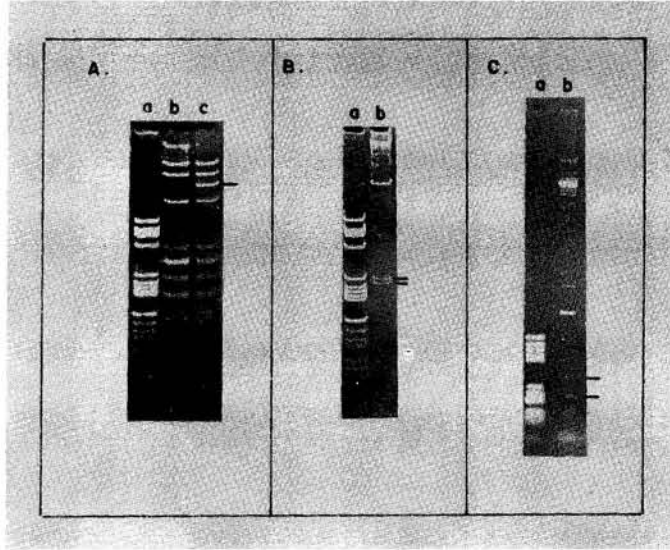


FIG. 4. Análisis de restricción del clon 8PAG. A. a. Fragmentos del pBR322 digerido con *Hae*III usados como marcadores de longitud conocida. b. FR de M13mp8 digerida con *Hae*III. c. FR del clon 8PAG digerida con *Hae*III (la línea indica la posición del fragmento de 1286 pb conteniendo la secuencia del gen IFN- α 2). B. a. pBR322 digerido con *Hae*III. b. FR del clon 8PAG digerida con las enzimas *Eco*RI y *Bg*III. (las líneas indican la posición de los fragmentos de 258 y 246 pb descritos en resultados). C. c. pBR322 digerido con *Hae*III. FR del clon 8PAG digerido con *Pvu*II (la línea indica la posición de los fragmentos de 304 y 201 pb descritos en resultados). Las electroforesis fueron realizadas en gels de poliacrilamida 5% a 100 V (A y B), o en agarosa 1% a 150 V (C).

clon 8 PAG



clon C3

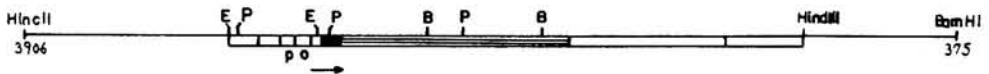


FIG. 5. Mapas de restricción de los clones 8PAG y C3. Clon 8PAG: mapa de restricción del fragmento lindante entre posiciones 5800 y 6300 del M13mp8. La porción del gen que codifica para el IFN maduro se indica en la zona rayada, y la correspondiente al péptido señal en la zona negra; *p* y *o* indican promotor y operador del operón *lac*. Las abreviaturas en la parte superior de cada esquema indican los diferentes sitios de restricción analizados. Clon C3: mapa de restricción del fragmento lindante entre posiciones 3906 y 375 del pBR322.

Clonaje del gen de fusión *lacZ*/IFN- α 2 en pBR322

A pesar de los resultados antes mostrados, se observó que el clon 8PAG era muy inestable, produciéndose un alto número de deleciones en cada repique. Se decidió entonces, y previo a toda otra manipulación transferir el fragmento *Hae*III-*Hind*III de 1274 pb, conteniendo el promotor/operador del gen *lacZ* y las secuencias del IFN- α 2 (ver figura 5) a un sistema más estable, como el plásmido pBR322. El fragmento antes mencionado (figura 6Aa), que se extiende desde el sitio *Hae*III ubicado en la posición 6037 del M13mp8, al sitio *Hind*III de la posición 6261 del mismo vector, fue purificado a partir de un gel preparativo (figura 6Ab y c), y clonado en el plásmido pBR322, previamente linealizado con la enzima de restricción *Eco*RI, tratado con ADN polimerasa I (Fragmento de Klenow) para rellenar los terminales producto de la restricción con la enzima antes mencionada, y finalmente restringido con la enzima *Hind*III.

Los productos de la ligación se utilizaron para transformar la *E. coli* HB101, obteniéndose 35 clones Ap^rTc^s. Cinco de estos clones fueron analizados con enzimas de restricción y por su capacidad de producir IFN. Dos de estos plásmidos (contenidos en los clones C3 y T3), presentaron los característicos segmentos de 201 y 304 pb, después de la restricción con la enzima (*Pvu*II, figura 6Ba y c). Como se observa en la figura 6C, los clones C3 y T3 presentaron también una actividad antiviral detectable en sus extractos, de un valor de 273 unidades/ml.

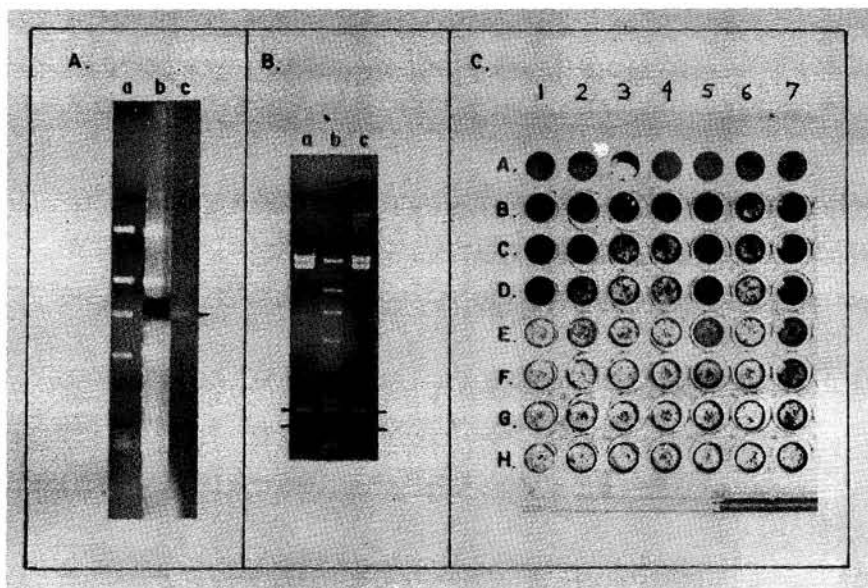


FIG. 6. Clonaje del gen de fusión *lacZ*/IFN- α 2 presente en el clon M13mp8 recombinante 8PAG en el plásmido pBR322. A. a y b. Digestiones analíticas y preparativa respectivamente de la RF del 8PAG con *Hae*III y *Hind*III. c. Una alícuota del fragmento de 1274 pb aislado de b, fue analizada. La electroforesis fue en geles de agarosa 1% durante toda una noche a 30 V. B. Análisis de restricción de los plásmidos pC3 (a) y pT3 (c) con *Pvu*II. La posición de los fragmentos de 304 y 201 pb se indican. La FR del clon 8PAG digerida con *Hae*III se usó como marcador (b). C. Actividad antiviral en extractos bacterianos. Fotografía de una placa de microtitulación que muestra la actividad de IFN proveniente de bacterias transformadas. La placa fue teñida con cristal violeta como se describe en *Materiales y Métodos*. Línea 1 (A --> D), control de células; línea 1 (E --> H) control de virus; línea 2, estándar del laboratorio de IFN leucocitario humano; líneas 3 a 7, extractos crudos de *E. coli* clones CB8, Cl, C3, G1 y T3 respectivamente.

Tanto el plásmido recombinante obtenido, como la producción de IFN, fueron completamente estables en estos clones, aun después de más de 20 repiques. El clon C3 fue seleccionado para posteriores manipulaciones. Un mapa de restricción detallado del plásmido contenido en este clon se observa en la figura 5, parte inferior. Es de destacar que el sitio *EcoRI* original de la posición 4360 en el pBR322 fue regenerado durante la construcción del clon C3, por ligación del extremo *EcoRI* rellenado con ADN polimerasa I, al extremo *HaeIII* del fragmento conteniendo el gen IFN-*alpha* 2 proveniente del clon 8PAG. De esta manera, el plásmido pC3 contenido en este clon posee un fragmento de expresión portable *EcoRI* de aproximadamente 200 pb con las secuencias promotor/operador, unión del ribosoma y codón de iniciación del gen *lacZ*, útil para algunos tipos de manipulaciones genéticas.

Con la finalidad de acortar aún más el péptido de fusión que precede al extremo amino terminal del interferón maduro, una nueva estrategia fue llevada a la práctica. Como se observa en la figura 5 (inferior), el plásmido pC3 posee 2 sitios para la enzima *EcoRI* y 4 sitios para *PvuII* (el sitio *PvuII* de la posición 2065 del pBR 322, y 3 sitios ubicados en el inserto). Por lo antedicho, el plásmido pC3 fue digerido en forma parcial con *EcoRI* y *PvuII* respectivamente, con la finalidad de obtener una porción de moléculas cortadas en un solo sitio para cada enzima. Los cortes que se deseaban eran a nivel del *EcoRI* 6231 del M13mp8 y contenido en este inserto, y a nivel de *PvuII* ubicado en la secuencia señal. Posteriormente se rellenó el extremo 5' del terminal *EcoRI* con ADN polimerasa I (Klenow), pero solo suplementada con deoxiATP, y se digirió levemente el terminal con nucleasa S1 para remover la zona de simple cadena remanente. De acuerdo con esta secuencia de reacciones, el producto de ligación ubicaría nuevamente en fase de traducción a la secuencia proveniente del IFN-*alpha* 2 con la secuencia inicial del gen *lacZ*. Los extremos romos así obtenidos fueron ligados, y los productos fueron utilizados para un nuevo ensayo de transformación en *E. coli* HB101.

De los clones Ap^rTc^s obtenidos se hizo un relevamiento por ensayo de IFN, para detectar clones productores de actividad antiviral mayor a las 600 u/ml. Sobre 434 clones analizados, se obtuvieron 2 clones con producción mayor a las 600 u/ml. Uno de ellos fue analizado con más detalle. Este clon fue capaz de producir más de 5 000 u/ml de extracto entre las 2-3 h. post inducción con IPTG (clon S1D3). La actividad específica del IFN en este extracto crudo fue de aproximadamente 4 000 u/ml. A su vez, experiencias preliminares de secuenciamiento confirmarían que este gen codificaría para un producto polipeptídico con 14 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal del IFN-*alpha* 2 maduro. Los primeros 6 aminoácidos serían del extremo amino terminal de la *beta*-galactosidasa, y los 8 aminoácidos restantes serían parte de la secuencia del péptido señal del pre-IFN.

DISCUSION

Resultados obtenidos en este laboratorio (Denoya *et al.*, en proceso de publicación), y en otros (Goeddel *et al.*, 1980; Nagata *et al.*, 1980; Dworkin-Rastl, 1983), demuestran que la producción de una actividad antiviral en *E. coli* es solo de 10^4 - 10^5 u/ml de cultivo, cuando el gen de IFN clonado conserva la secuencia líder o señal (pre-IFN). Por otra parte, cuando esta secuencia señal es completamente removida (Goeddel *et al.*, 1980; Dworkin-Rastl, 1983, la producción aumenta en 2 a 3 órdenes de magnitud. Recientemente, el grupo de Slocombe *et al.* (1982), lograron expresar el gen del IFN-*alpha* 2 por remoción de una región de la secuencia señal, que abarca desde el codón de iniciación ATG hasta el sitio *PvuII* ubicado en esta secuencia,

y posterior fusión de este gen al gen *lacZ* del bacteriófago M13mp7. El producto polipeptídico, logrado por estos autores poseía 19 aminoácidos adicionales al amino terminal del IFN-*alpha* 2 maduro, siendo 11 de estos provenientes del amino terminal de la *beta*-galactosidasa, y los 8 restantes del péptido señal.

El clon recombinante 8PAG del bacteriófago M13mp8, o su derivado (clon C3) en el plásmido pBR322, posee una delección de la secuencia señal que abarca desde el codón de iniciación ATG hasta el sitio de clivaje de la enzima *Hae*III, ubicado en el codón 10 de esta secuencia. El gen del pre-IFN-*alpha* 2 así delecionado, está fusionado al gen *lacZ* del M13mp8, habiéndose obtenido una secuencia cuyo producto polipeptídico posee 21 aminoácidos adicionales al amino terminal del IFN-*alpha* 2 maduro. Siete aminoácidos son provenientes del amino terminal de la *beta* galactosidasa, aparece un aminoácido nuevo (Pro), originado como producto de la formación de un nuevo codón durante la fusión, y los restantes 13 aminoácidos son provenientes del péptido señal. No obstante, la actividad biológica producida en cultivo fue de niveles similares a los obtenidos cuando se analizan clones con el gen del pre-IFN-*alpha* 2 completo. Por otra parte, durante la construcción del clon S1D3, la remoción de un segmento equivalente a 7 codones, desde el codón número 6 del gen presente en el clon C3, hasta el codón número 13 donde se ubica el sitio de clivaje de la enzima *Pvu*11, fue determinante para lograr un aumento de producción de aproximadamente 20 veces.

El grupo de Slocombe *et al.* (1982), demostró que la presencia de hasta 11 aminoácidos adicionales de la *beta*-galactosidasa, no parece alterar las propiedades biológicas de la actividad antiviral del IFN. Los resultados aquí presentados mostraron también que el polipéptido sintetizado posee inalteradas las propiedades de IFN, a pesar de constituir un producto de fusión. Finalmente, los resultados de los autores antes citados y los aquí detallados, demuestran que para la conversión de la actividad tipo pre-IFN a la actividad tipo IFN maduro, es requisito indispensable la remoción al menos parcial de la secuencia señal, desde el codón de iniciación hasta el sitio de restricción *Pvu*II, ubicado en el codón número 15 de esta secuencia.

REFERENCIAS

- BACKMAN, K. y M. PTASHNE (1978). *Maximizing Gene Expression on a Plasmid Using Recombination "in Vitro"*. Cell 13, 65-70.
- BOLIVAR, F. y K. BACKMAN (1979). *Plasmids of Escherichia coli as Cloning Vectors*. Methods Enzymol. 68, 245-248.
- BOYER, H. W. y D. ROULLAND-DUSSOIX (1969). *A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA in Escherichia Coli*. J. Mol. Biol. 41, 459-464.
- DENOYA, C.D.; A. R. TREVISAN; J. ZORZOPULOS; E. RUBEGLIO y M. WOŁOJ (1981). *Detection and Characterization of Plasmids in Clinical Isolates of Pathogenic Bacteria*. Proceedings, International Symposium on Genetic Engineering, Brasil, pp. 97-101.
- DWORKIN-RASTL, E.; P. SWETLY y M. B. DWORKIN (1983). *Construction of Expression Plasmids Producing High Levels of Human Leukocyte-Type Interferon in Escherichia Coli*. Gene 21, 237-248.
- GOEDDEL, D.; E. YELVERTON; A. ULLRICH; H. HEYNEKER; G. MIOZZARI; W. HOLMES; P. SEEBURG; T. DULL; L. MAY; N. STEBBING; R. CREA; S. MAEDA; R. MCCANDLISS; A. SLOMA; J. TABOR; M. GROSS; P. FAMILLETTI y S. PESTKA (1980). *Human Leukocyte Interferon Produced by Escherichia Coli is Biologically Active*. Nature 287, 411-416.

- GOEDDEL, D. V.; D. W. LEUNG; T. DULL; M. GROSS; R. LAWN; R. MCCANDLISS; P. SEEBUR; A. ULLRICH; E. YELVERTON y P. GRAY (1981). *The Structure of Eight Distinct Cloned Human Leukocyte Interferon cDNAs*. *Nature* **290**, 20-26.
- LAWN, R.; M. GROSS; C. HOUCK; A. FRANKE; P. GRAY y D. GOEDDEL (1981). *DNA Sequence of a Major Human Leukocyte Interferon Gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **78**, 5435-5439.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MAXAM, A. M.; W. GILBERT (1977). *A New Method for Sequencing DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 5460-564.
- MESSING, J. (1981). *M13mp2 and Derivatives: A Molecular Cloning System for DNA Sequencing, Strand Specific Hybridization, and in Vitro Mutagenesis*. En: *Proceedings of the Third Cleveland Symposium on Macro-Molecules: Recombinant DNA*. (A. Walton, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 143-153.
- NAGATA, S.; H. TAIRA; A. HALL; L. JOHNSRUD; M. STREULI; J. ECSÖDI, W. BOLL; K. CANTELL y C. WEISSMANN (1980). *Synthesis in E. Coli of a Polypeptide with Human Leukocyte Interferon Activity*. *Nature* **284**, 316-320.
- PESTKA, S. (1983). *The Human Interferons. From Protein Purification and Sequence to Cloning and Expression in Bacteria: Before, Between and Beyond*. *Archives of Biochem. Biophys.* **221**, 1-37.
- RUBINSTEIN, S.; P. C. FAMILLETTI y S. PESTKA (1981). *Convenient Assay for Interferons*. *J. Virol.* **37**, 755-758.
- RUIZ TREVISAN, A.; J. ZORZOPULOS y C. D. DENOYA (1984). *Metodología para la preparación y análisis de plásmidos de un gran número de cepas bacterianas*. *Revista Argentina de Microbiología* (en proceso de publicación).
- SCHUGURENSKY, A.; P. CAHN; G. OSATNIK; J. ZORZOPULOS; A. RUIZ TREVISAN y C. D. DENOYA (1984). *An Outbreak of Multiply Resistant Staphylococcus Aureus in Buenos Aires. Clinical Observations and Plasmid Pattern Analysis*. *Medicina (Buenos Aires)* **44**, 8-14.
- SLOCOMBE, P.; A. EASTON; P. BOSELEV y D. BURKE (1982). *High-Level Expression of an Interferon $\alpha 2$ Gene Cloned in Phage M13-p7 and Subsequent Purification with a Monoclonal Antibody*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **79**, 5455-5459.
- STEWART, W. E. II (1979). *The Interferon System*. Springer-Verlag, New York.
- STREULI, M.; S. NAGATA y C. WEISSMANN (1980). *At Least Three Human Type Alpha Interferons: Structure of Alpha 2*. *Science* **209**, 1343-1347.
- THURING, R. W. J.; J. P. SANDERS y P. BORST (1975). *A Freeze-Squeeze Method for Recovering Long DNA from Agarose Gels*. *Anal. Biochem.* **66**, 213-217.
- ZORZOPULOS, J.; A. R. TREVISAN y C. D. DENOYA (1984). *Deletions in Klebsiella Pneumoniae R Plasmids Induced by Growth in the Presence of Acridine Orange at High Temperature*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **25**, 659-661.

* Dirigir correspondencia a:

Dr. Claudio D. Denoya, Department Microbiology, The Public Health Research Institute of the City of New York, Inc., 455 First Avenue, New York, New York 10016, U.S.A.