

## Trabajos originales

# Caracterización del interferón gamma humano radiomarcado por biosíntesis

J. WIETZERBIN y R. FALCOFF

Unité INSERM 196

Institut Curie, Section de Biologie

26, Rue d'Ulm, 75221 Paris Cedex 05, France

*Récebido el 20 de junio de 1985*

### RESUMEN

Se efectuó el radiomarcaje del interferón gamma humano con  $^3\text{H}$ -leucina y  $^{14}\text{C}$ -lisina en cultivos de linfocitos PHA-inducidos. Cerca del 35 por ciento del material marcado insoluble en TCA y casi toda la actividad antiviral presente en el supernadante se adsorbió en ácido silícico y se extrajo del mismo, permitiéndose una purificación casi 100 veces mayor (act. esp.  $2 \times 10^7 \mu/\text{mg}$  de proteína). Se analizó la extracción de esta preparación de IFN  $\gamma$  por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS con inmunoprecipitación específica o sin ella, mediante anticuerpos anti-IFN  $\gamma$  purificados. Se detectaron varios componentes radiomarcados con PM aparentes de 15, 20, 25, 30, 45 y 50 K... después de la fluorografía en preparaciones no tratadas, y se observó una banda mayoritaria de 25 K y una banda minoritaria de 20 K después de la inmunoprecipitación en interferón purificado sobre sefarsa azul. Se analizaron las preparaciones de IFN radiomarcado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS bajo condiciones no desnaturalizadoras. La actividad antiviral extraída del gel coincidió con las bandas radiomarcadas de cerca de 80 y 45 000 MW. Cuando se analizaron ambas bandas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, dieron lugar a una banda radiactiva mayoritaria de 25 K. Estos resultados sugieren que el interferón gamma humano nativo es fundamentalmente un dímero de dos moléculas de 25 K.

### SUMMARY

Radiolabelling of human  $\gamma$  IFN with  $^3\text{H}$ -leucine and  $^{14}\text{C}$ -lysine was carried out in PHA-induced lymphocyte cultures. About 35-percent of the TCA insoluble labelled material and almost all the antiviral activity present in the supernatant could be adsorbed by and eluted from silicic acid, allowing about 100 fold purification (sp. act.  $2 \times 10^7 \mu/\text{mg}$  protein). This eluted  $\gamma$  IFN preparation was analysed by SDS-PAGE with or without specific immunoprecipitation by purified anti- $\gamma$  IFN antibodies. Several radiolabelled components with apparent MW of 15, 20, 25, 30, 45, 50 K... were detected after

fluorography in untreated preparations while one major band of 25 K and one minor band of 20 K were observed after immunoprecipitation in blue sepharose-purified interferon. Radiolabelled  $\gamma$  IFN preparations were analysed by SDS-PAGE under non-denaturing conditions. The antiviral activity eluted from the gel coincided with radiolabelled bands of about 80 and 45 000 MW. Both bands gave rise to a major radioactive 25 K band when analysed by SDS-PAGE. These results suggest that native human interferon gamma is mostly a dimer constitute of two 25 K molecules.

## INTRODUCCION

La estimulación mitogénica de linfocitos induce la síntesis de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), al mismo tiempo que otras moléculas biológicamente activas, que reciben el nombre genérico de linfoquinas (Wietzerbin *et al.*, 1984). Estas moléculas presentan funciones *helper* o *suppressor*, desempeñando un rol esencial en la regulación del sistema inmunitario (Hamblin *et al.*, 1984; Kirchner, 1984). Una característica común de estas moléculas es su elevada actividad específica, que les permite ejercer una acción biológica a concentraciones inferiores a  $10^{-9}$  M. Esta particularidad ha permitido poner a punto métodos de purificación a pesar de la baja cantidad de proteína activa presente en las preparaciones. Sin embargo, teniendo en cuenta las interacciones que algunas linfoquinas pueden manifestar en los diversos tests biológicos utilizados, nos pareció importante introducir el análisis de material radiomarcado por biosíntesis para valorar los métodos de purificación que habíamos aplicado a preparaciones estándares, y caracterizar con mayor precisión la presencia posible de linfoquinas contaminantes. Por otro lado, algunos estudios bioquímicos del interferón gamma pudieron ser realizados gracias a la radiactividad de la molécula.

## MATERIAL Y METODOS

### Preparación de interferón gamma

Linfocitos humanos provenientes de la circulación periférica fueron obtenidos de dadores sanos por citaféresis. Generalmente  $9-10 \times 10^9$  células pueden ser colectadas de cada dador, de las cuales alrededor de 90 por ciento son linfocitos y 2-5 por ciento monocitos. Después de dos lavados en PBS, la suspensión celular a la concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 (Boehringer), suplementado con 5 por ciento de suero fetal bovino, 15 mM de tricina pH 7,2 y 2 mM glutamina, es estimulada con 1 por ciento de la solución de PHA-P de Eurobio (Francia). Los cultivos son incubados a 37°C en frascos Belco bajo agitación (160 rpm) durante 18-20 horas (Wietzerbin *et al.*, 1984). Los sobrenadantes recuperados por centrifugación son procesados inmediatamente o congelados a -70°C.

### Preparación de interferón radiactivo

Una suspensión de linfocitos a la concentración de  $20 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI, deficiente en leucina y lisina, fue incubada en presencia de 40 uCi/ml de [ $^3$ H] leucina y 4 uCi/ml de [ $^{14}$ C] lisina. La elección de estos aminoácidos fue decidida teniendo en cuenta la composición

en aminoácidos del interferón, deducida de la secuencia de su c-ADN: 10 residuos Leu y 21 residuos Lys. Además, es muy probable que dada la cantidad de leucina empleada, todas las proteínas neosintetizadas sean igualmente marcadas.

En algunas preparaciones se utilizó [ $^3$ H] lisina solamente para marcar preferencialmente el interferón. Después de una hora a 37°C, el cultivo fue diluido a  $5 \times 10^6$  células/ml en RPMI como indicado precedentemente, pero con sólo 20 por ciento de la concentración habitual del (o) de los aminoácidos utilizados para el marcado. El suero fetal bovino fue dializado previamente. Una alícuota de la suspensión celular es incubada sin PHA, el resto recibe PHA y la incubación se prolonga 20 horas. Los sobrenadantes son procesados inmediatamente.

### Titulación del interferón gamma

El título de interferón se determina por la medida de la inhibición del efecto citopatogénico inducido por el virus de la *stomatitis* vesicular en cultivos de células Wish. Los títulos son expresados en unidades internacionales, usando la referencia interferón gamma de N.I.H. (USA). Por este método, nuestras preparaciones tienen títulos que varían entre 8 000 y 32 000 U/ml para las preparaciones estándares, y aproximadamente de 8 000 U/ml para las radiactivas.

### Purificación del interferón gamma

#### Adsorción sobre ácido silícico

El método está basado en el procedimiento publicado por Van Damme *et al.* (1981). Los sobrenadantes de incubación de linfocitos son agitados durante tres horas, a 4°C, en presencia de 10 mg/ml de ácido silícico estéril (Fluka) al cabo de las cuales se centrifugan en frío a 5 000 rpm. El interferón es adsorbido por el ácido silícico. El sedimento de ácido silícico es lavado dos veces con tampón de fosfato sódico 0,02 M, pH 7,2 (PB), seguido de un lavado con el mismo tampón que contiene 1 M ClNa. El interferón es eluido del ácido silícico por el etilenglicol 50 por ciento en tampón PB, 1,4 M ClNa, agitando una hora a 4°C (Wietzerbin *et al.*, 1984). El volumen utilizado para la elución es, en general, 1/10 del volumen inicial. La velocidad de agitación debe ser adaptada a los volúmenes para asegurar el mantenimiento en suspensión del ácido silícico. La preparación de interferón gamma en etilenglicol es estable a -70°C durante varios meses.

#### Cromatografía en columna de azul Sefarosa

El volumen del gel es de 4 ml en una columna de 9 mm de diámetro, equilibrado con tampón PB. La cromatografía se efectúa a 4°C, a una velocidad constante de elución de 20 ml/cm<sup>2</sup>/hora. Las preparaciones a purificar son dializadas contra el mismo tampón PB. Fracciones de 0,5 ml son recogidas en tubos de plástico. Los tubos pares contienen 0,2 ml de una solución al 1 por ciento de albúmina bovina para evitar la inactivación del interferón, y son, por lo tanto, destinadas a las titulaciones, reservando para los análisis bioquímicos las fracciones impares.

#### Inmunoprecipitación y electroforesis en gel de poliacrilamida

Las técnicas empleadas fueron descritas anteriormente (Stéfanos *et al.*, 1985).

## RESULTADOS

La figura 1 corresponde a la autorradiografía de una electroforesis de las preparaciones de interferón y del control, preparados simultáneamente. Esta imagen ofrece una idea de la cantidad de proteínas secretadas por los linfocitos como respuesta a la PHA.

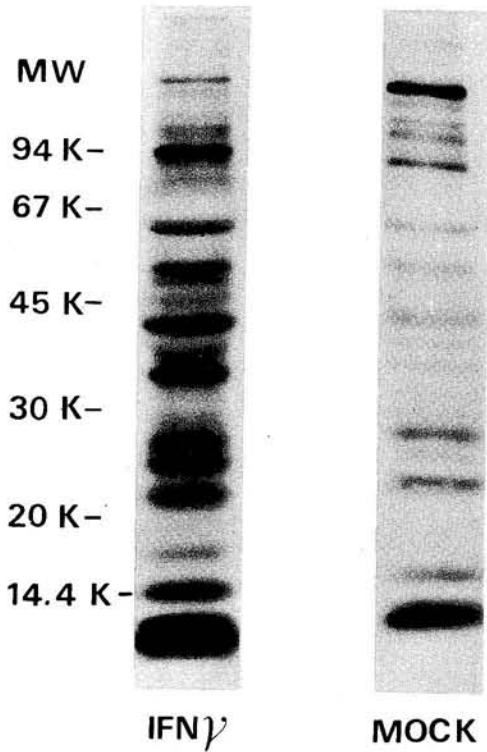


FIG. 1. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de una preparación de interferón gamma natural, radiomarcada por biosíntesis y de su respectivo control. El gel utilizado es un gradiente de poliacrilamida 7,5-15 por ciento. La imagen fue obtenida por fluorografía del gel seco.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la primera etapa de purificación del interferón gamma radiactivo. Como en el caso de las preparaciones no radiactivas (Wietzerbin *et al.*, 1984), prácticamente toda la actividad antiviral es fijada por el ácido silícico y eluida en las condiciones descritas en métodos. Por otro lado, solo 1 a 3 por ciento de proteínas son eluidas con el interferón, lo que equivale a una purificación aproximada a las 100 veces.

Es interesante constatar que las proteínas radiactivas, es decir, las neosintetizadas por los linfocitos en presencia de radioisótopos, y que incluyen evidentemente las linfoquinas, presentan una afinidad de absorción al ácido silícico muy superior a la de las proteínas del medio de cultivo (35 por ciento en lugar de 1-3 por ciento).

El material resultante de la elución del ácido silícico fue cromatografiado en una columna de azul sefarosa. El resultado de una cromatografía analítica está representado en la figura 2. La mayor proporción de radiactividad es fijada a la matriz. El interferón es eluido concentrado en pocas fracciones, coincidiendo con el pico de radiactividad (fracciones 31-32). Otras linfoquinas, en particular IL-2, son eluidas posteriormente. Combinando las dos etapas, ácido silícico y cromatografía sobre azul sefarosa, puede llegarse a un factor de purificación de alrededor de 4 000, y una actividad específica de  $10^7$  unidades por mg de proteína.

Tabla I  
PURIFICACION PARCIAL POR ADSORCION AL ACIDO SILICICO  
DE INTERFERON GAMMA HUMANO RADIOACTIVO

Fracción	Radiactividad	Proteínas	Interferón
Interferón gamma crudo	100	100	100
No adsorbido por el ácido silíceico	65	97-99	1
Eluido del ácido silíceico (*)	35	1-3	100

(\*) Título del interferón gamma eluido =  $1 \times 10^5$  U/ml,  $5 \times 10^5$  cpm/ml,  $2 \times 10^5$   $\mu$ /mg proteína.

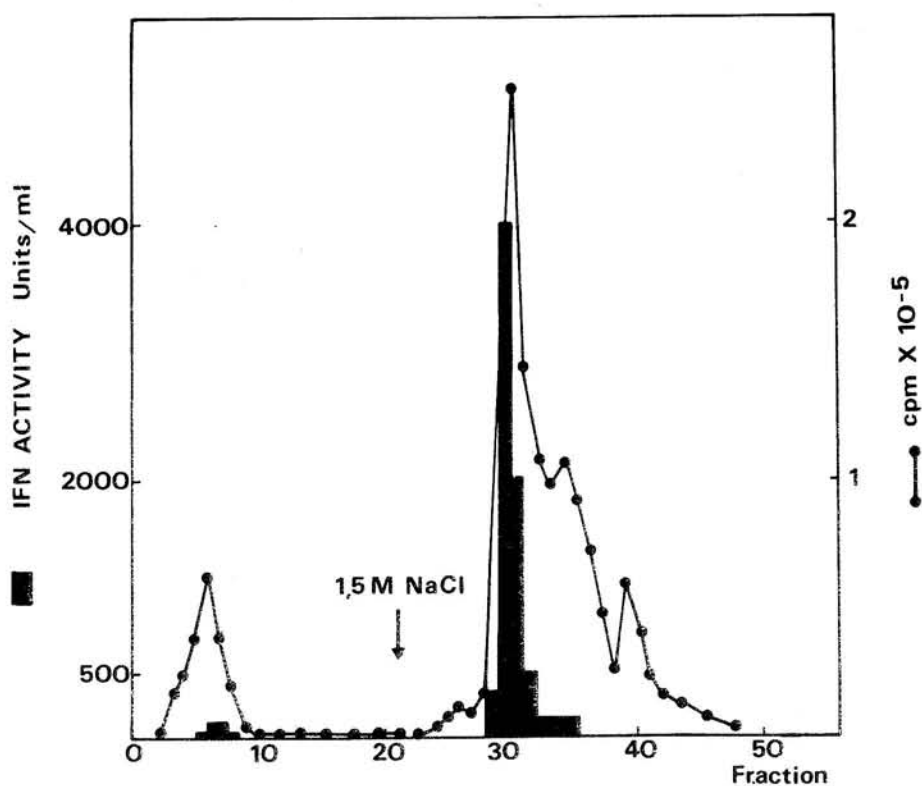


FIG. 2. Cromatografía analítica en columna de azul sefarosa de una muestra de interferón gamma humano marcado por biosíntesis. El material utilizado para la cromatografía es una alícuota de una preparación previamente purificada por el método del ácido silíceico.

El análisis por electroforesis y autorradiografía de la preparación eluida de ácido silíceico y de la fracción 31, se muestra en la figura 3. Se observó una banda mayor de peso molecular 25 000, que es acompañada por pocas bandas de débil marcado, principalmente una de peso molecular 20 000.

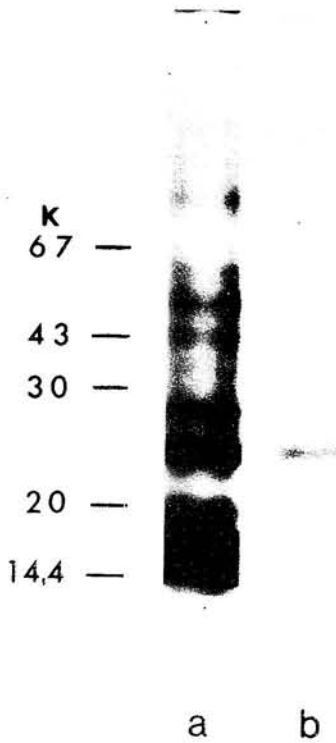


FIG. 3. Fluorografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (7.5-15 por ciento) de la fracción 31 eluida de la columna de azul sefarosa: *a* = material de partida; *b* = fracción 31.

La banda 25 K es reconocida por anticuerpos anti-interferón gamma purificados (Stéfanos *et al.*, 1985). Los complejos obtenidos por inmunoprecipitación del material eluido del ácido silíceo y de la fracción 31, analizados por electroforesis y autorradiografía muestran la misma banda 25 K; la banda menor 20 K es también visible.

Si bien estos resultados pueden indicar que la banda 25 K es el interferón gamma, el peso molecular no coincide con el de 45 K-50 K obtenido por tamizado molecular (Falcoff, 1972).

Para confirmar la identidad de la banda 25 K con la actividad antiviral, fue necesario recuperar interferón biológicamente activo del gel de poliacrilamida. Teniendo en cuenta la inactivación superior a 95 por ciento del interferón gamma por la acción del SDS y del  $\beta$ -mercaptoetanol, se efectuó una electroforesis preparativa en medio no desnaturalante, es decir, en ausencia de SDS, de una preparación de interferón semipurificada y concentrada a  $10^6$  U/ml.

La figura 4 muestra los niveles de actividad antiviral recuperados por elución en PBS de fracciones del gel. Se obtuvo un pico biológicamente activo, de PM de 40-43 K, resultado concordante con los obtenidos por tamizado molecular.

Otro pico de PM aparente de 70-80 K presenta igualmente actividad antiviral. Cada uno de estos picos fue sometido a una electroforesis en presencia de SDS; en estas condiciones, se vuelve a poner en evidencia una banda radiactiva a 25 K, como lo muestra el examen densitométrico de la autorradiografía (figura 5). Aparecen igualmente bandas de menor importancia, 40 K (dímero residual?), 20 K y 15 K. La proteína de peso molecular 70-80 K, origina exclusivamente una banda 25 K. Cuando una preparación de interferón concentrada de título muy elevado es sometida directamente a la electroforesis con SDS, se obtiene igualmente 2 a 5 por ciento de la actividad antiviral inicial eluida de la fracción de gel correspondiente a 25 K.

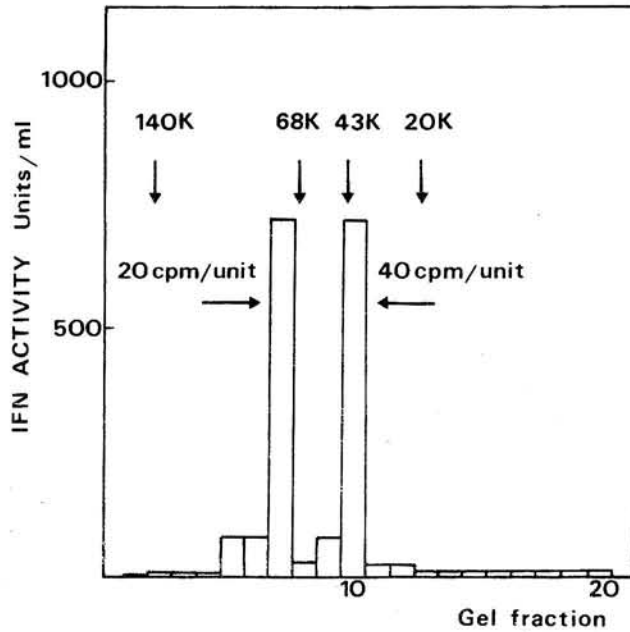


FIG. 4. Elución de la actividad interferón de una electroforesis efectuada en condiciones no desnaturalantes (sin SDS). 5 000 unidades en 50  $\mu$ l fueron depositadas en un gel de poliacrilamida (10 por ciento). Después de la migración, el gel fue cortado, cada fracción incubada 18 horas en PBS-albúmina, bajo agitación. La actividad antiviral y la radioactividad fueron determinadas en el sobrenadante después de haber eliminado la poliacrilamida por centrifugación. La recuperación del interferón fue cuantitativa.

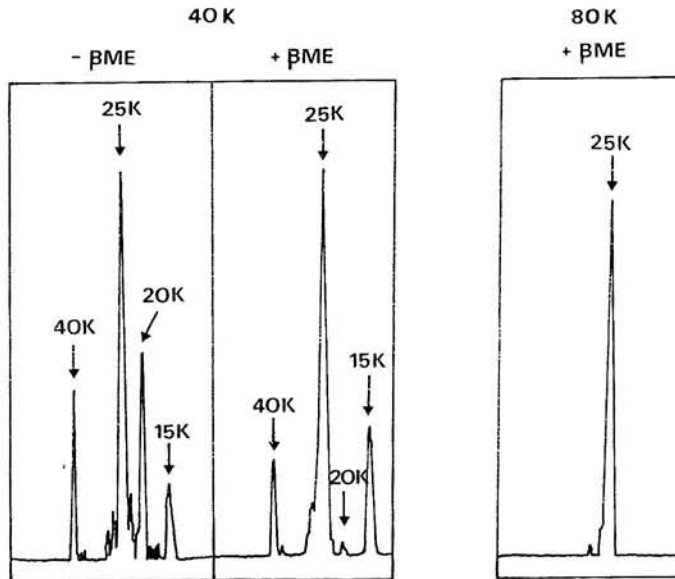


FIG. 5. Análisis por electroforesis en condiciones desnaturalantes (SDS) de las especies moleculares 40 K y 80 K obtenidas en la experiencia descrita en la figura 5. La figura muestra la densitometría de la autorradiografía.

Esta actividad residual es neutralizada por anticuerpo anti-interferón gamma (Stéfanos *et al.*, 1985), y por anticuerpos policlonales preparados contra un péptido correspondiente a la secuencia N-terminal (Johnson *et al.*, 1982). La actividad antiviral 25 K no es neutralizada por antisueros anti-interferón alfa o beta (tabla 2).

Tabla 2  
PROPIEDADES ANTIGENICAS DEL INTERFERON GAMMA HUMANO 25 K,  
ELUIDO DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Muestra	Título (unidades/ml)
Interferón gamma	128
+ antisuero anti-interferón alfa	96
+ antisuero anti-interferón beta	128
+ antisuero anti-interferón gamma	< 4
+ antisuero antisequencia N-terminal	< 4

- \* Los antisueros 1, 2 y 4 fueron provistos por los doctores K. Berg, A. Billiau y H. Johnson respectivamente. El antisuero anti-interferón gamma fue preparado en nuestro laboratorio por el doctor S. Stéfanos.
- \* 128 unidades de interferón eluidas de un gel de poliacrilamida-SDS fueron incubadas durante dos horas a 37°C en presencia de los antisueros indicados a una concentración suficiente para neutralizar 500 a 1 000 unidades del interferón homólogo. Después de la incubación, la actividad interferón remanente fue determinada sobre células Wish como se indicó en "Métodos".

## DISCUSION

El interferón gamma humano es una glicoproteína con características diferentes a los interferones alfa y beta. Mientras la síntesis de estos últimos puede ser inducida por la infección viral o por la acción de ARN bicatenario, el interferón gamma es producido solamente en linfocitos bajo la estimulación de mitógenos de células T o por antígenos específicos. La molécula natural presenta un peso molecular de 45-50 K, siendo el producto de un gene único que incluye tres intrones (Gray y Goeddel, 1982). El PM del interferón gamma obtenido por recombinación genética es de 17 K. Los resultados aquí presentados indican que el interferón gamma natural obtenido en los linfocitos estimulados por PHA es principalmente un homodímero constituido por dos moléculas de PM 25 K. La diferencia entre los pesos moleculares del monómero nativo y de la proteína codada por el gen del interferón gamma, debe ser atribuida a la glicosilación del primero. Cuando células eucariotas fueron transfectadas con el gen estructural del interferón gamma, se observó igualmente una proteína antiviral de PM aparente de 45 K, que por electroforesis en presencia de SDS daba origen a una banda mayor de 25 K y una menor de 20 K (Devos *et al.*, 1982).

Estas dos bandas 25 K y 20 K, fueron también descritas por Yip *et al.* (1982) en interferón gamma obtenido con PHA en presencia de TPA. En nuestro caso, la banda 20 K es solo un componente menor y es probable que resulte de una degradación parcial de la molécula en el curso de su purificación. Sin embargo, no podemos desechar la hipótesis de una diferencia en el grado de glicosilación. En efecto, estudios realizados por Rinderknecht *et al.* (1982) sobre un interferón gamma inducido por SEA y timocina  $\alpha'$  han mostrado una heterogeneidad en la glicosilación que explicaría los dos pesos moleculares. Estos autores encontraron igualmente



diferencias (terminaciones precoces) en la región C-terminal. En nuestras preparaciones, la presencia casi exclusiva de 25 K indicaría una glicosilación uniforme. Debemos señalar que este interferón es obtenido en sólo 20 horas de incubación, a diferencia de los otros métodos que prolongan en varios días el cultivo, posibilitando la acumulación de moléculas heterogéneas.

La utilización de material radiactivo nos ha procurado la sensibilidad necesaria para definir algunas propiedades bioquímicas del interferón gamma, controlar la purificación del interferón gamma natural y visualizar en las preparaciones las otras proteínas sintetizadas *de novo* y secretadas durante la estimulación linfocitaria.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la doctora Josiane Sanceau, por su ayuda en la preparación del interferón gamma radiomarcado, a Corinne Gaudet por su valiosa ayuda técnica y a Agnès Géhant por la preparación del manuscrito.

## REFERENCIAS

- DEVOS, R.; H. CHEROUTRE; Y. TAYA; W. DEGRAVE; VAN HEUVERSWYN y W. FIERS (1982). *Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukariotic cells*. Nucleic Acids Res., 8: 2487-2501.
- FALCOFF, R. (1972). *Some properties of virus and immune-induced human lymphocyte interferons*. J. Gen. Virol., 16: 251-253.
- GRAY, P. W. y D. V. GOEDDEL (1982). *Structure of the human immune interferon gene*. Nature, 298: 859-863.
- HAMBLIN, A. S. (1985). *Molecular cloning lends credence to lymphokine research*. Immunology Today, 6: 38.
- JOHNSON, H. M.; M. P. LANGDORF; B. LAKHCHAURA; T. S. CHAN y H. STANTON (1982). *Neutralization of a native human gamma interferon (HuIFN-cDNA) by antibodies to a synthetic peptide encoded by the 5' end of HuIFN-cDNA*. J. Immunol., 129: 2357-2359.
- KIRCHNER, H. (1984). *Interferon gamma*. En: Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Springer Verlag Berlin and Heidelberg, 1: 170-203.
- RINDERKNECHT, E.; B. H. O'CONNOR y H. RODRIGUEZ (1984). *Natural human interferon gamma: complete amino-acid sequence and determination of sites of glycosylation*. J. Biol. Chem., 259 (11): 6790-6797.
- STEFANOS, S.; J. WIETZERBIN; L. CATINOT; J. P. KOLB y R. FALCOFF (1985). *Isolation of polyclonal monospecific anti-human gamma antibodies from an antiserum directed against human interferon gamma and lymphokines*. J. IFN Res., 5: 39-43.
- STEFANOS, S.; J. WIETZERBIN; L. CATINOT; R. DEVOS y R. FALCOFF (1985). *Characterization of antibodies against recombinant human interferon gamma produced by hybridoma cells*. J. IFN Res., 5 (3) (en imprenta)
- VAN DAMME, J.; M. DE LEY; M. CLAEYS; H. BILLIAU; C. VERMYLEN y P. DE SOMER (1981). *Interferon induced in human leukocytes by concanavalin A: Isolation and characterization of alpha and beta type components*. Eur. J. Immunol., 11: 937-942.
- WIETZERBIN, J.; J. P. KOLB; A. SENIK; L. DE STEPANI; G. ANDREU; E. FALCOFF y R. FALCOFF (1984). *Studies on purification of human gamma interferon: chromatographic behavior of accompanying IL-2 and B-cell helper activity*. J. IFN Res., 4: 141-152.
- YIP, Y. K.; B. S. BARROWCLOUGH; C. URBAN y J. VILCEK (1982). *Purification of two subspecies of human gamma (immune) interferon*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79: 1820-1824.