

Altos niveles de expresión del gen del interferón α -2 humano bajo el control del promotor derecho del fago λ en *E. coli*

A. SILVA, J. DE LA FUENTE, G. PÉREZ, Y. QUINONES, V. JIMÉNEZ, L. NOVOA Y L. HERRERA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en diciembre de 1987

RESUMEN

El gen del interferón α -2 humano (IFN-2) fue expresado en *E. coli* bajo el control del promotor derecho del bacteriófago λ (PR). La expresión de la actividad de IFN-2 en células que contenían este plásmido fue termoinducible. Se lograron niveles de expresión de hasta 5×10^8 UI/l.

SUMMARY

The gene coding for the human α -2 interferon was expressed in *E. coli* under the control of the λ right promoter. Expression of interferon activity from cells carrying these plasmids was thermo-inducible. The expression levels obtained were up to 5×10^8 UI/l.

INTRODUCCION

Los interferones son proteínas secretadas que inducen una respuesta antiviral en sus células diana y poseen propiedades inmunorreguladoras y antitumorales (Isaacs y Lindenmann, 1957; Stewart II, 1980). De acuerdo con sus propiedades antigénicas, biológicas y químicas, los interferones humanos se dividen en tres grupos: interferón α leucocitario y linfoblastoide, interferón β fibroblastoide y el interferón γ o inmune (Stewart II, 1980).

Los interferones α humanos han sido producidos utilizando diferentes sistemas en levadura (Hitzeman *et al.*, 1981, 1983; Singh *et al.*, 1984); células de mamíferos (Weissmann *et al.*, 1983); gusano de seda (Maeda *et al.*, 1985); *B. subtilis* (Schein *et al.*, 1986) y *E. coli*, utilizando diferentes promotores: β -lactamasa (Nagata *et al.*, 1980); trp (Goeddel *et al.*, 1980; Yelverton *et al.*, 1981; Dworkin-Rastl *et al.*, 1983); lac (Edge *et al.*, 1981; Slocombe *et al.*, 1982; Ruiz Treviñan *et al.*, 1986); recA (Freinstein *et al.*, 198); tet-trip (Dijkema *et al.*, 1984); trp-lac (Vaks *et al.*, 1984) y fosfatasa alcalina (Miyake *et al.*, 1985). Se han logrado niveles de expresión de hasta 5×10^9 IU/l (Slocombe *et al.*, 1982).

En este trabajo nosotros hacemos el primer reporte sobre la expresión del IFN α -2 en *E. coli* bajo el control del PR con niveles de expresión de hasta 5×10^8 UI/l.

MATERIALES Y METODOS

Todas las manipulaciones se hicieron según Maniatis et al., 1982.

Cepas bacterianas

MC-1061 (F- HsdR ara- leu- galV galK lacx74 rps131 StraA)
N5656 (hist- ilv- gal- lacZ Tn10 (c1857 Δ Bam N₇ N₅₃ Δ H1)
W310 (F- supF supE hsdR galK TrpR metB lacY tonA)
W3110L (F- supF supE hsdR galK TrpR metB lacY tonA (c1857 Δ Bam N₇ N₅₃ HI)

Medios de cultivo

LB: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cloruro de sodio 10 g/l.

SB: triptona 30 g/l, extracto de levadura 20 g/l, cloruro de sodio 10 g/l.

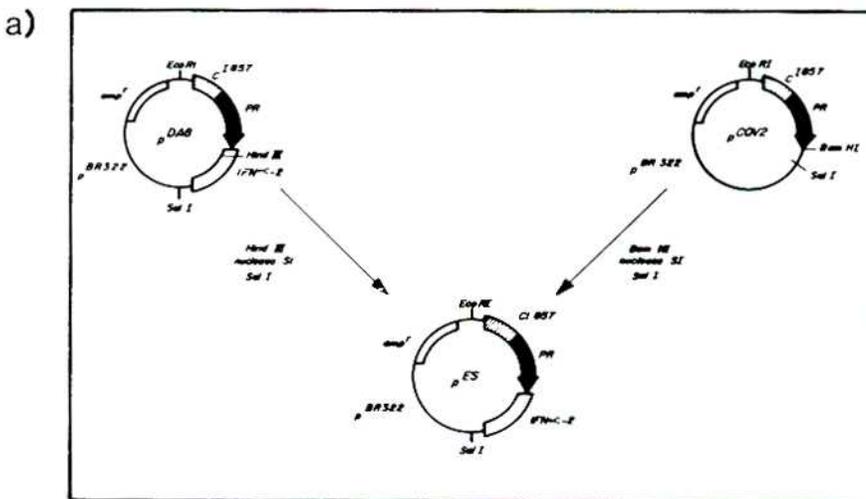
SLBH: triptona 11 g/l, extracto de levadura 22.5 g/l, glicerol 4 ml/l, hidrógeno fosfato de potasio(1M) 51 ml/l, dihidrógeno fosfato de potasio (1M) 15,7 ml/l.

Enzimas de restricción y modificación

Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por las casas comerciales: HidIII, BamHI, Sally T4 ligasa, producidas por Enzibiot; Sau3A BRL; Klenow, S1 y PNK por Boheringer.

Construcción de los plásmidos de expresión pES

El esquema seguido para la construcción está representado en la figura 1a. El plásmido pDA-8 (De la Fuente et al., en prensa) fue digerido con HindIII, tratado con nucleasa S1 y digerido posteriormente con Sall. Esta digestión deja libre el fragmento correspondiente al gen del IFN α -2, que ya tiene el primer codón de la proteína madura. El fragmento obtenido se insertó en plásmido pCQV2 (Queen, C., 1983), que previamente se cortó con BamHI, se trató con nucleasa S1 y se digirió con Sall. La secuencia exacta de la juntura está representada en la figura 1b.



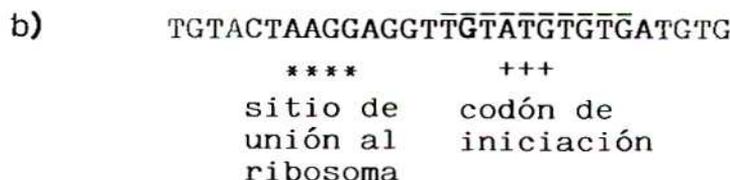


FIG. 1. Construcción de los plásmidos de expresión pES: a) Estrategia seguida en la construcción. Ver los detalles en materiales y métodos; b) Secuencia de nucleótidos de la unión entre el gen del IFN- α 2 y el promotor PR en los plásmidos pES.

Inducción de la actividad antiviral en *E. coli*

Los clones transformados de *E. coli* se crecieron en medio Luria Broth a 32°C hasta una DO=0,6, momento en que el cultivo se indujo a 42°C incubándose luego a 39°C.

Ensayo de la actividad de IFN

Una vez inducidos los cultivos, la biomasa se concentró cinco veces, se resuspendió en una solución de tris-clorhídrico 50 mM, pH 8 y cloruro de sodio 30 mM, y se rompió por ultrasonido. Posteriormente, la mezcla sonificada se centrifugó y se analizó la actividad de IFN en el sobrenadante.

El análisis de la actividad de IFN en el sobrenadante se realizó mediante el método de la reducción del efecto citopático en células Hep-2, desafiadas con el virus Mengo.

Western blot

El western blot se realizó según Tombin et al., 1979 y Burnett et al., 1981.

RESULTADOS

Comparación de los niveles de expresión de diferentes plásmidos de la construcción final (serie pES) en la cepa MC-1061

Los diferentes clones del plásmido de expresión obtenidos en *E. coli* fueron transformados en la cepa MC-1061. Los cultivos se crecieron a 32°C hasta una DO de 0,6. Después se indujeron a 42°C durante 15 minutos y se continuó su crecimiento a 39°C por 1,5 horas. Se obtuvieron niveles de expresión que variaban desde 3×10^7 UI/l hasta $3,5 \times 10^8$ UI/l (tabla 1). El clon con mejores niveles de expresión fue el pES-21.

Tabla 1

COMPARACION DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE IFN-ALPHA 2 DE DIFERENTES PLASMIDOS DE LA CONSTRUCCION FINAL (SERIE pES) EN LA CEPA MC-1061

Plásmido	Actividad antiviral (UI/l)
pES-10	$1,2 \times 10^8$
pES-15	$6,8 \times 10^7$
pES-21	$3,5 \times 10^8$
pES-22	$2,3 \times 10^8$
pES-27	$7,4 \times 10^7$
pES-43	$3,2 \times 10^7$
pES-47	$3,9 \times 10^7$
pES-48	$1,6 \times 10^8$

Influencia del medio de cultivo en los niveles de expresión de IFN α -2

La expresión de IFN α -2 del clon pES-21 transformado en MC-1061, fue estudiada en diferentes medios de cultivo: LB, SB y SLBH. Los cultivos se crecieron a 32°C hasta DO 0,6; se indujeron a 42°C por 15 minutos y se crecieron posteriormente a 39°C por 1,5 horas. El análisis de la actividad de IFN α -2 en el sobrenadante mostró que los mejores resultados se obtenían en medio SLBH, lográndose niveles de expresión de hasta 5×10^8 UI/l (figura 2). Los más altos niveles de IFN α -2 coinciden con la mayor densidad óptica alcanzada por los cultivos en medio SLBH (datos no mostrados).

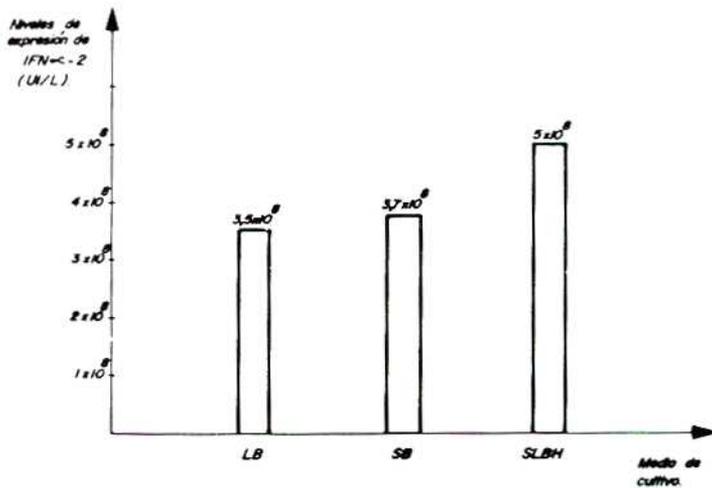


FIG. 2. Influencia del medio de cultivo en los niveles de expresión de IFN- α 2. La figura muestra la comparación entre la actividad antiviral producida por el clon pES-21, transformado en MC1061 y crecido en diferentes medios de cultivo.

Influencia de la cepa hospedera y condiciones de crecimiento en los niveles de expresión de IFN α -2

El clon pES-21 se transformó en diferentes cepas: MC-1061, N5656, W3110 y W3110L. Los cultivos fueron crecidos a 32°C hasta DO 0,6 inducidos a 42°C por 15 minutos y crecidos posteriormente a 39°C por 12, 18 y 28 horas.

En experimentos realizados se observó que el IFN α -2 se encontraba, en gran medida, insoluble y asociado a la membrana celular. Por este motivo, los niveles de expresión se analizaron en un *Western blot* utilizando anticuerpos policlonales obtenidos en nuestro laboratorio (figura 3a). Como se aprecia en la figura 3b, la cepa que dio niveles más altos de IFN α -2 fue la 1061 a las 18 horas de crecimiento postinducción. En la N5656, W3110 y W3110L, también se observaron los niveles más altos a las 18 horas. A partir de los datos obtenidos del *Western blot* (figura 3a), se puede estimar que la cantidad de IFN α -2 producido en la cepa MC-1061 constituye aproximadamente el 1% del contenido total de proteínas. Si se compara este resultado con los títulos de actividad antiviral obtenidos, puede comprobarse que el IFN α -2 producido se encuentra, en gran medida, insoluble.

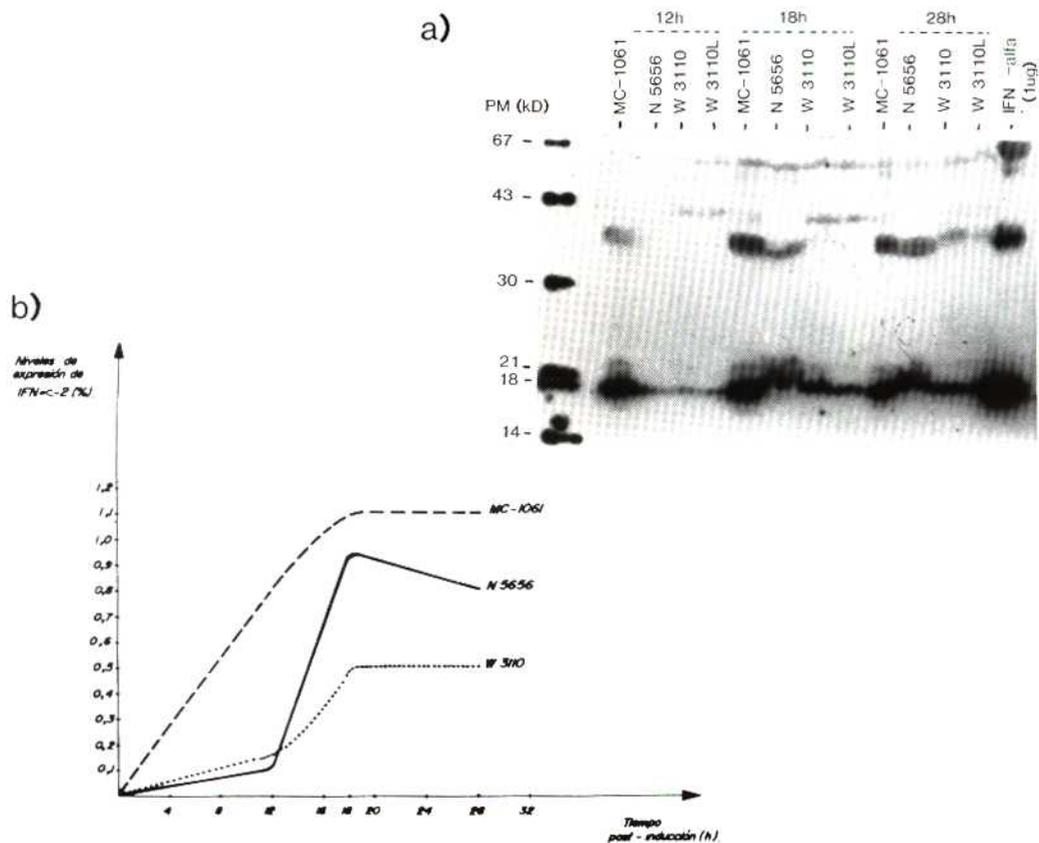


FIG. 3. Influencia de la cepa hospedera y condiciones de crecimiento en los niveles de expresión de IFN- α 2: a) Autorradiograma del Western blot; b) Curva de producción de IFN- α 2 recombinante durante el crecimiento de los clones bacterianos.

DISCUSION

Los niveles de expresión obtenidos con el clon pES-21 en MC-1061 fueron de $3,5 \times 10^8$ UI/l (tabla 1). Con la multiplicación de este clon en diferentes medios de cultivo se logró aumentar los niveles de IFN/L de cultivo hasta 5×10^8 UI/l en medio SLBH (figura 2). Este medio, por ser el más rico, permitió alcanzar los niveles más altos de densidad óptica del cultivo, permitiendo esto el incremento en los niveles de producción de IFN α -2.

Los niveles de expresión de 5×10^8 UI/l obtenidos por nosotros en este trabajo son 10 veces más bajos que los reportados por Slocombe *et al.*, utilizando el promotor lactosa (Slocombe *et al.*, 1982). En nuestro laboratorio, trabajando con el promotor triptófano, hemos obtenido niveles de 2×10^9 UI/l (Silva *et al.*, resultados sin publicar). Esta diferencia en los niveles de expresión de IFN α -2 puede venir dada por la diferencia en la fortaleza de los promotores y por diferencias en las estructuras secundarias del ARN mensajero, que como se ha reportado, influyen en la eficiencia del proceso de traducción (Tessier *et al.*, 1984; Stanssens *et al.*, 1985; Looman *et al.*, 1986).

Para analizar con más profundidad esta última posibilidad, realizamos un estudio de las estructuras secundarias de los ARN mensajeros de las construcciones del IFN α -2 bajo el PR (pES) y el promotor triptófano (pTRIP) (figura 4). Como resultado de este análisis observamos

que la secuencia de unión al ribosoma en la construcción con el PR (pES) se encuentra apareada formando una estructura cuya energía libre es de -19,8 cal/mol. La diferencia en los niveles de expresión de IFN α -2 pudiera explicarse, al menos en parte, por este fenómeno, pues la construcción con el pTRIP no posee este apareamiento en la secuencia de unión al ribosoma, quedando ésta libre para una iniciación de la traducción más eficiente.

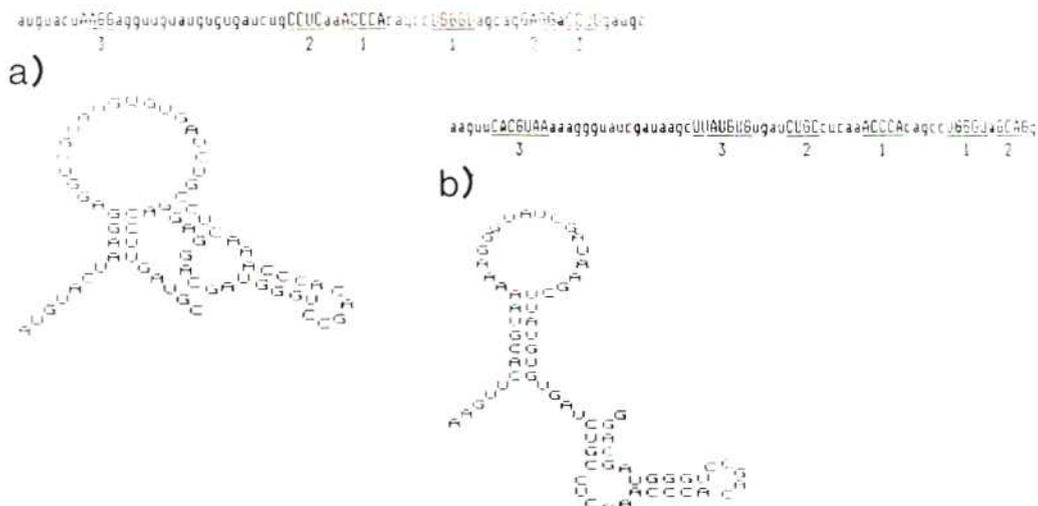


FIG. 4. Comparación de la estructura secundaria de los ARN mensajeros de las construcciones del IFN- α 2 bajo él: a) PR (pes); b) Promotor triptófano (pTRIP). Las zonas que intervienen en el apareamiento están indicadas por números.

En este trabajo se demuestra que el PR ofrece un sistema eficiente de expresión de genes heterólogos en *E. coli*. Para aumentar los niveles de expresión, sería posible utilizar sistemas de proteínas fusionadas (Botterman *et al.*, 1987) para mejorar la secuencia de unión al ribosoma y la estructura secundaria del ARN mensajero en esta zona, lográndose así un aumento en la eficiencia del proceso de traducción. Esta secuencia tendría que ser finalmente removida del extremo amino-terminal de la proteína recombinante de interés.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a S. Pérez por su valiosa colaboración técnica; a R. Bringas por la determinación de la estructura secundaria y a A. Seralena por la preparación de las figuras.

REFERENCIAS

- BOTTERMAN, J.; H. HOFTE y M. ZABEAU (1987). *High-level expression of genes under control of CRO translation initiation signals in Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, **6**:71-81.
- BURNETT, N. N. (1981). *Electrophoretic transfer of proteins from sds-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein*. A. Anal. Biochemistry, **112**: 195-203.
- DIJEMA, R.; P. POWELS; A. DE REUS y H. SCHELLEKENS (1984). *Structure and expression in Escherichia coli of a cloned rat interferon α gene*. Nucleic acids research, **12**: 1227-1243.
- DWORKIN-RASTL, E.; P. SWETLY y B. DWORKIN (1982). *Construction of expression plasmids producing high levels of human leukocytes-type interferon in escherichia coli*. Gene, **21**: 237-248.
- EDGE, M. D.; A. R. GRINNE; G. R. HEATHCLIFFE; P. A. MEACOCK; W. SCHUCH; D. B. SCANLON; T. C.

- ATKINSON, C. R. NEWTON y A. F. MARKHAM (1981). *Total synthesis of a human leukocyte interferon gene*. Nature, **292**: 756-762.
- FEINSTEIN, S. I.; Y. CHERNAJOVSKY; L. CHEN; L. MAROTTEAUX y Y. MORY (1983). *Expression of human interferon genes using the rec A promoter of Escherichia coli*. Nucleic Acids Research, **11**: 2927-2941.
- GOEDEL, D. V.; E. YELVERTON; A. ULLRICH; H. L. HEYNEKER; G. MIOZARI; W. HOLMES; P. H. SEEBURG; J. DULL; L. MAY; N. STEBBING; R. CREA; S. MAEDA y R. McCANDLIS (1981). *Bacterial synthesis of a novel human leukocyte interferon*. Nucleic acids research, **9**: 731-741.
- HITZEMAN, R. A.; D. W. LEUNG; L. J. PERRY; W. J. KOHR; H. L. LEVINE y D. V. GOEDEL (1983). *Secretion of human interferons by yeast*. Science, **219**: 620-625.
- HITZEMAN, R. A.; F. E. HAGIE; H. L. LEVINE; D. V. GOEDEL; G. AMMERER y B. D. HALL (1981). *Expression of a human gene for interferon in yeast* Nature, **293**: 717-722.
- ISAACS, A. y J. LINDENMANN (1957). Proc. R. Soc., **147**: 258-267.
- LOOMAN, A. C.; J. B. LAENDER; M. DE GRUYTER y P. H. VAN KNIPPENBERG (1986). *Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in Escherichia coli*. Nucleic Acids Research, **14**: 5481-5496.
- MAEDA, S.; T. KAWAT; M. OBINATA; H. FUJIWARA; T. HORIUCHI; Y. SAEKI; Y. SATO y M. FURUSAWA (1985). *Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector*. Nature, **315**: 592-594.
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N. York.
- MIYAKE, T.; T. OKA; T. NISHIZAWA; F. MISOKA; FUWA; K. YODA; M. YAMASAKI y G. TAMURA (1985). *Secretion vector containing a promoter and signal sequence of alkaline phosphatase gene of Escherichia coli*. J. Biochem., **97**: 1429-1436.
- NAGATA, S.; H. TAIRA; A. HALL; L. JOHNSRUD; M. STREULI; J. ECSODI; W. BOLL; K. CANTELL y CH. WEISSMANN (1980). *Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity*. Nature, **284**: 316-320.
- PATRICK, S.; E. REMAUT y W. F. F. F. (1985). *Alterations upstream from Shine-Delgarno region and their effect on bacterial gene expression*. Gene, **36**: 21-223.
- QUEEN, C. (1983). *A vector that uses phage signals for efficient synthesis of proteins in Escherichia coli*. Journal of molecular and applied genetics, **2**: 1-10.
- SCHEIN, C. H.; K. KASHIWASI; A. FUJISAWA y CH. WEISSMANN (1986). *Secretion of mature IFN α -2 and accumulation of uncleaved precursor by bacillus subtilis transformed with a hybrid α -amylase signal sequence IFN- α -2 gene*. Bio/Technology, **4**: 719-725.
- SINGH, A.; V. M. LUGOVOY; M. V. KOHR y L. J. PERY (1984). *Synthesis secretion and processing of α -factor-interferon fusion proteins in yeast*. Nucleic Acids Research, **12**: 8927-8938.
- SLOCOMBE, P.; A. EASTON; P. BOSELEY y D. C. BURKE (1982). *High-level expression of an interferon α -2 gene cloned in phage M13mp7 and subsequent purification with monoclonal antibody*. Biochemistry, **79**: 5455-5459.
- STEWART, W. E. II. (1980). *In the interferon system*. Springer, New York.
- TESSIER, L. H.; P. SONDEMAYER; T. FAURE; D. DREYER; A. BENAVENTE; D. VILLEVAL; M. COURNEY y J. LECOQ (1984). *The influence of mRNA primary and secondary structure on human IFN- γ gene expression in E. coli*. Nucleic Acids Research, **12**: 7663-7674.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN y J. GORDON (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**: 4350-4354.
- TREVISAN, A. R.; A. PESCE; M. CRISCUOLO; A. DIAZ; A. CORLEY; C. DENOYA y J. ZORZOPULOS (1986). *Estudio sobre la producción de un interferón recombinante α humano expresado bajo el control del promotor LAC UV5 de Escherichia coli*. Interferón y Biotecnología, **3**: 211-223.
- VAKS, B.; Y. MORY; J. U. PEDERSON y O. HOROVITZ (1984). *A semi-continuous process for the production of human interferon α from E. coli using tangential-flow microfiltration and immuno-affinity-chromatography*. Biotechnology letters, **6**: 621-626.
- WEISSMANN, C.; S. NAGATA; W. BOLL; M. FOUNTOLAKIS; A. FUJISAWA; J. I. FUJISAWA; J. HAYNES; K. HENCO; N. MANTEI; H. RAGG; C. SCHEINE; J. SCHMID; G. SHAW; M. STREULI; H. TAIRA; K. TODOKORO y U. WEIDLE (1983). *Structure and expression of human α -interferon genes*. Interferons, pp. 295-326.
- YELVERTON, E.; D. LEUNG; P. WECK; P. W. GRAY y D. GOEDEL (1981). *Bacterial synthesis of a novel human leukocyte interferon*. Nucleic Acids Research, **9**: 731-741.