*Interferón y Biotecnología, Vol. 6, No. 1, 44-51 (1989)*

# Trabajos originales cortos

## Caracterización química del interferón humano alfa-2 recombinante

V. MORERA,[1] V. SHEMIAKYN,[2] I. NAZIMOV[2] y L. CASTELLANOS[1]

[1] **Laboratorio de Química de Proteínas. Agrupación de Vacunas y Medios de Diagnóstico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba**

[2] **Instituto de Química Bioorgánica "Shemiakyn". Academia de Ciencias de la URSS. Moscú, URSS**

*Recibido en septiembre de 1988*
*Aprobado en noviembre de 1988*

### RESUMEN

El interferón humano alfa-2 recombinante con alto grado de pureza, expresado en *E. coli*, fue analizado con vistas a verificar su secuencia aminoacídica. El análisis de aminoácidos permitió comprobar que el contenido aminoacídico de la molécula es correcto. Mediante estudios de cromatografía líquida de alta eficacia se evaluó la pureza de la proteína. Se obtuvieron los mapas peptídicos con diferentes proteasas y métodos químicos, aislándose de una de estas digestiones los péptidos trípticos para su secuenciación automática. Se determinó que una parte del material se inicia en metionina y otra en cisteína. La secuencia aminoacídica de la proteína se verificó, coincidiendo esta con la secuencia predicha a partir de la secuencia del gen clonado. Se estableció la secuencia C-terminal mediante análisis enzimático.

### SUMMARY

Human Alpha-2 Recombinant Interferon, expressed in *E. coli* and with high purity, was analyzed so as to verify the aminoacid sequence. The aminoacid analysis demonstrated that the aminoacid content of the molecule is correct. Through high pressure liquid chromatography, the protein was evaluated in terms of purity. Peptide maps were obtained with different proteases and chemical methods, isolating from one of these digestions the tryptic peptides for automatic sequencing. It was established that part of the material starts with a methionine and the rest with a cysteine. The primary sequence of the protein was verified, being coincident with the predicted sequence due to the structure of the cloned gene. The C-terminal sequence was established by enzymatic analysis.

### INTRODUCCION

Los interferones son proteínas que se caracterizan por poseer una potente acción antiviral, así como propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas tumorales. Ya desde su descubrimiento (Isaacs y Lindenmann, 1957) comienzan a ser evidentes las posibilidades de aplicación clínica de estas moléculas. El estudio de sus efectos biológicos y clínicos, determinó que se impulsaran las investigaciones encaminadas a estimular la síntesis de estos productos por vía natural (células productoras) y su purificación hasta lograr preparados ricos en estas sustancias (Cantell, 1981 a y b;

**Copyright © 1989, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón**
**Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba**

Bodo, 1981; Leong, 1981) y paralelamente la clonación de genes de interferón humano en bacterias, asociados a promotores que garantizan una alta expresión (Pestka, 1981).

La tecnología del ADN recombinante ha hecho posible la producción de proteínas deseadas en abundancia; cada nueva proteína recombinante obtenida debe ser estudiada para confirmar su secuencia aminoacídica predicha por la secuencia nucleotídica del gen clonado. Con este fin se han venido desarrollando métodos que hacen posible el análisis rápido y eficiente de la estructura primaria. En este trabajo se reporta el uso de análisis de aminoácidos, mapeo peptídico, cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, análisis enzimático C-terminal y procedimientos de secuenciación para la caracterización del interferón humano alfa-2 recombinante.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudió la pureza de la proteína utilizando cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa en columna C-8 de poro ancho (300 Å, Baker), con un gradiente lineal de 0 % a 50 % de acetonitrilo con 0,1 % de ácido trifluoroacético en 30 minutos, con flujo de 0,8 ml/min. Se efectuó la detección simultánea a 226 nm y 280 nm. El equipo de HPLC utilizado está formado por un controlador de gradiente, dos bombas, un detector de longitud de onda fija (LKB), un inyector (Rheodyne) provisto de un lazo de 2 ml, un detector de longitud de onda variable y un horno (Knauer), un registrador de dos canales (LKB) y un procesador de datos (Chromatopack CR-3A, Shimadzu).

### Análisis de aminoácidos

Los análisis de aminoácidos se realizaron en tres condiciones diferentes.

**Hidrólisis ácida:** una alícuota correspondiente a 0,5 nmol de proteína pura se hidrolizó durante 24 horas a 110 grados y vacío con 100 µl de HCl 6N (analaR,BDH) (0,1 % de fenol y 0,1 % de betamercaptoetanol) (Glazer *et al.*, 1976).

**Hidrólisis ácida de la proteína oxidada (para la determinación de cisteína como ácido cisteico y de metionina como metionina sulfona):** 0,1 mg de la proteína se oxidó en 100 µl de ácido perfórmico durante 4 horas a cero grados. Se evaporó el ácido a vacío y 60 grados y se hidrolizó a continuación con 100 µl de HCL 6N, como se describió anteriormente (Glazer *et al.*, 1976).

**Hidrólisis con ácido mercaptoetanosulfónico (para determinar triptófano):** 0,5 mg de la proteína se hidrolizó con 500 µl de ácido mercaptoetanosulfónico durante 24 horas a 110 grados y vacío (Glazer *et al.*, 1976).

Los análisis se efectuaron en un analizador de aminoácidos Alpha Plus 4151 (LKB) utilizando una columna (270 mm x 4 mm) con intercambiador catiónico en sistema sodio. La detección se efectuó mediante fluorescencia con un fluorímetro (Waters). El procesamiento de datos se efectuó con un microprocesador de datos (Chromatopack CR-3A, Shimadzu).

### Mapas peptídicos

**Digestión con *Staphyloccocus aureus* V-8 (Serva):** se disolvieron 100 µg de proteína en 200 µl de acetato de amonio 0,1 M pH = 8,0 y se incubó durante 24 horas con una relación enzima/sustrato de 1/33 a 37 grados con agitación suave (Kamp, 1986).

**Hidrólisis con bromuro de cianógeno (Pierce):** 200 µg de la proteína se disolvieron en 400 µl de HCl 0,1 M en presencia de ditiotreitol. Se añadió un exceso molar de 300 veces de bromuro de cianógeno por residuos totales de metionina. La reacción se efectuó durante 24 horas a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno y en la oscuridad.

**Hidrólisis con ácido acético al 2 % (Analar, BDH):** 100 µg de la proteína se hidrolizaron con 100 µl de ácido acético al 2 % durante 15 horas a 100 grados en ampolleta de vidrio evacuada al vacío (Kamp, 1986).

**Digestión con TPCK-tripsina (Serva):** 200 µg de la proteína disueltos en N-etilmorfolina 0,1 M pH = 8,0 se trataron con TPCK-tripsina con una relación enzima/sustrato de 1/50 durante 6 horas a 37 grados, con agitación suave (Kamp, 1986).

Los péptidos obtenidos fueron separados mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (HPLC RP).

### Secuenciación

Una alicuota equivalente a 6 mg de la proteína dializada, reducida y liofilizada, se sometió a tratamiento con TPCK-tripsina en las condiciones descritas anteriormente. Se realizó la separación preparativa de los péptidos trípticos mediante HPLC RP en columna tipo C-8 (Merck) con gradiente lineal de 0 % a 100 % de acetonitrilo con 0,1 % de ácido trifluoroacético y flujo de 0,8 ml/min. Las fracciones conteniendo más de un péptido se recromatografiaron en columna C-18 (Merck) con gradiente de acetato de amonio 50 mM 40 %/n-propanol (60 %) como solvente B y ácido trifluoroacético 0,1 % en agua como solvente A. Las fracciones de los péptidos aislados fueron analizadas por el método del cloruro de dansilo para determinar el N-terminal.

Los péptidos puros fueron secuenciados automáticamente en un secuenciador en fase gaseosa (Applied Biosystems 477A-120A).

Se efectuó la secuenciación automática sobre la proteína intacta en un secuenciador (Knauer) para verificar el extremo N-terminal.

### Secuencia C-terminal

El análisis de secuencia C-terminal se efectuó utilizando carboxipeptidasa Y en tampón acetato de amonio 50 mM pH = 5,6. Fueron tomadas alicuotas de 50 µl y tratadas con 100 % de ácido tricloroacético para precipitar la proteína no hidrolizada. Por análisis de aminoácidos fueron cuantificados los residuos liberados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los análisis de aminoácidos se muestran en la tabla 1. Los valores obtenidos para la hidrólisis con HCL son los valores promedios de cinco determinaciones independientes. No fue posible determinar el contenido de prolina a causa de que la detección post-columna se efectuó con ortofluoraldehído. Este aminoácido fue comprobado en la secuenciación total de la proteína.

**Tabla 1**

**COMPOSICION AMINOACIDICA DEL IFN α-2 RECOMBINANTE**

| Aminoácido | *Valor teórico* | *Hidrólisis HCl* | *Oxidación perfórmica* | *Acido 3N-mercaptoetanosulfónico* |
|---|---|---|---|---|
| ASX | 12 | 11,9 | 11,5 | 11,4 |
| THR | 10 | 9,2 | 9,3 | 9,0 |
| SER | 14 | 12,9 | 12,7 | 8,3 |
| GLX | 26 | 25,8 | 25,7 | 26,3 |
| GLY | 5 | 6,0 | 4,9 | 4,9 |
| ALA | 8 | 7,9 | 7,9 | 7,5 |
| VAL | 7 | 6,4 | 6,5 | 6,0 |
| MET | 6 | - | 5,4 | - |
| ILE | 8 | 8,0 | 7,3 | 7,3 |
| LEU | 21 | 22,2 | 20,4 | 20,5 |
| PHE | 10 | 9,5 | 8,7 | 10,1 |
| HIS | 3 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| LYS | 10 | 9,0 | 9,4 | 9,6 |
| ARG | 10 | 9,5 | 9,5 | 10,0 |
| CYS | 4 | - | 3,2 | - |
| TRP | 2 | - | - | 1,5 |
| PRO | 5 | - | - | - |
| TYR | 5 | 4,8 | - | 4,8 |

La proteína fue estudiada mediante HPLC RP (figura 1).

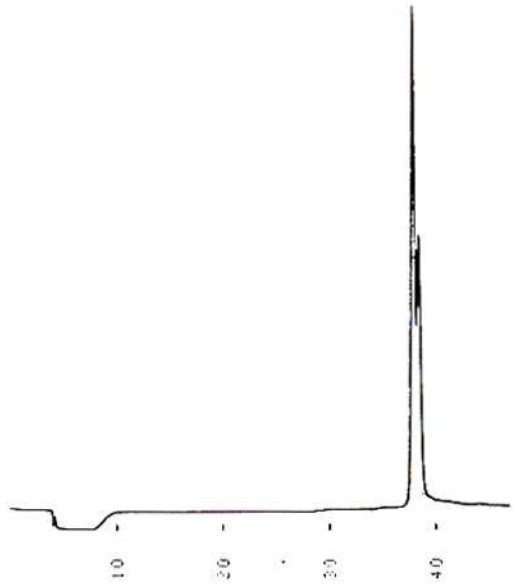


FIG. 1. Perfil cromatográfico en fase inversa del IFN α-2 recombinante.

Los mapas peptídicos obtenidos mediante el uso de proteasas o métodos químicos se muestran en las figuras 2 a la 5.

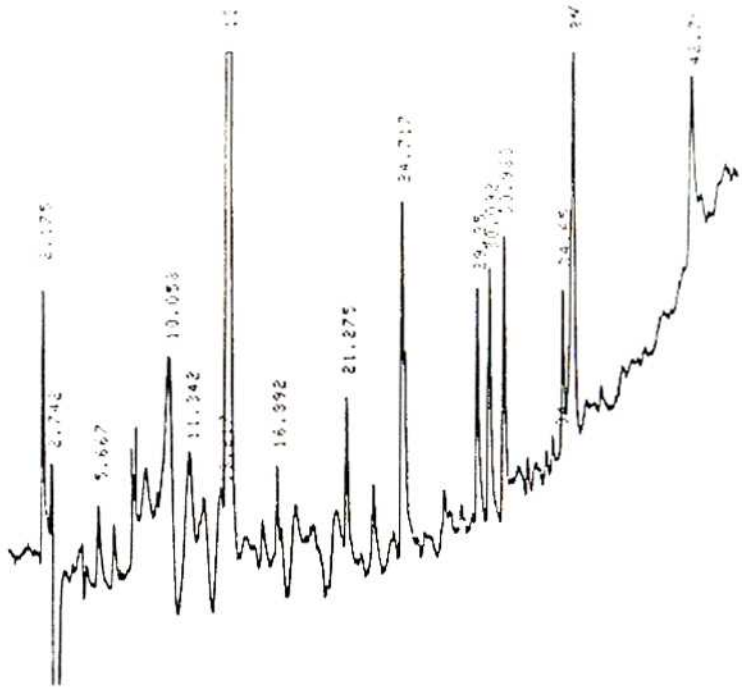


FIG. 2. Mapa del IFN α-2 recombinante con *Staphylococcus aureus* V-8 proteasa.

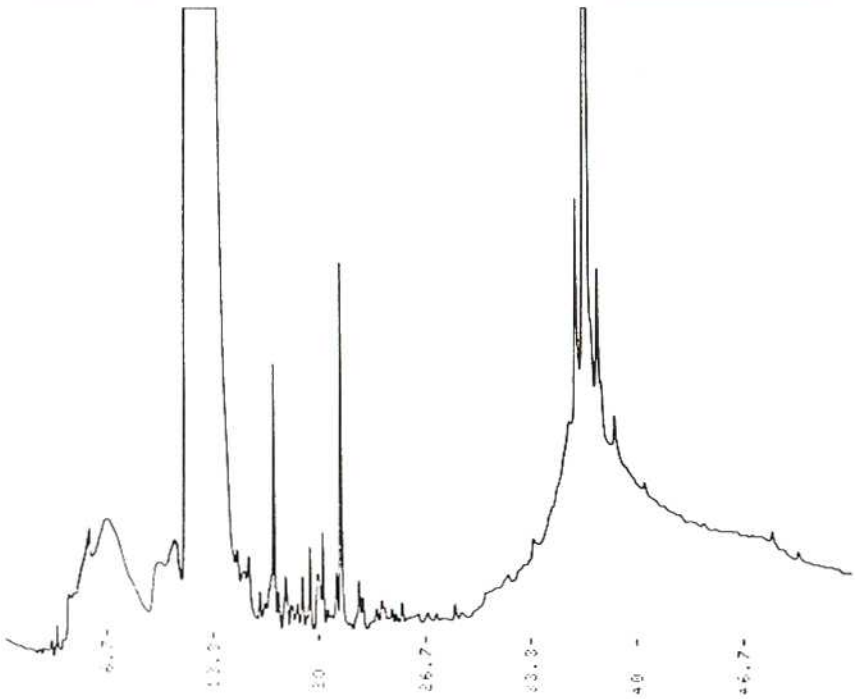

FIG. 3. Mapa del IFN α-2 recombinante con bromuro de cianógeno.

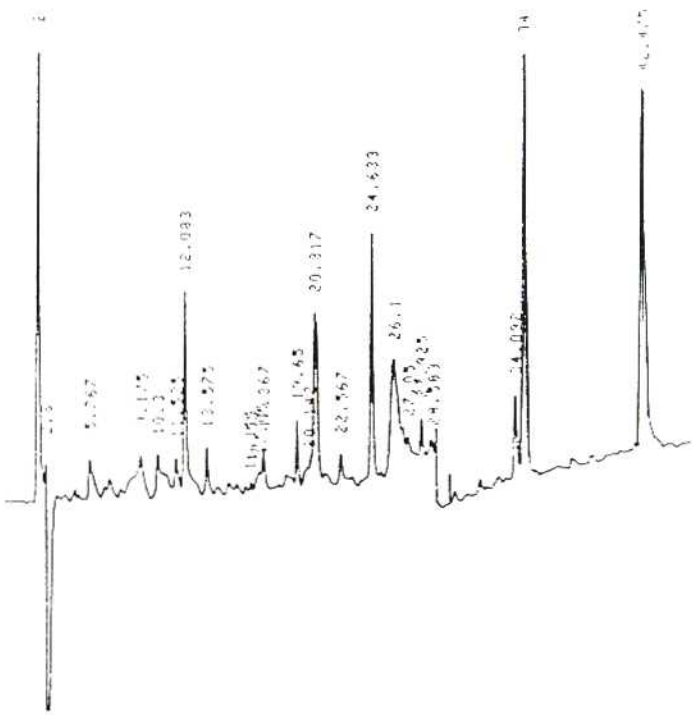

FIG. 4. Mapa del IFN α-2 recombinante con ácido diluido.

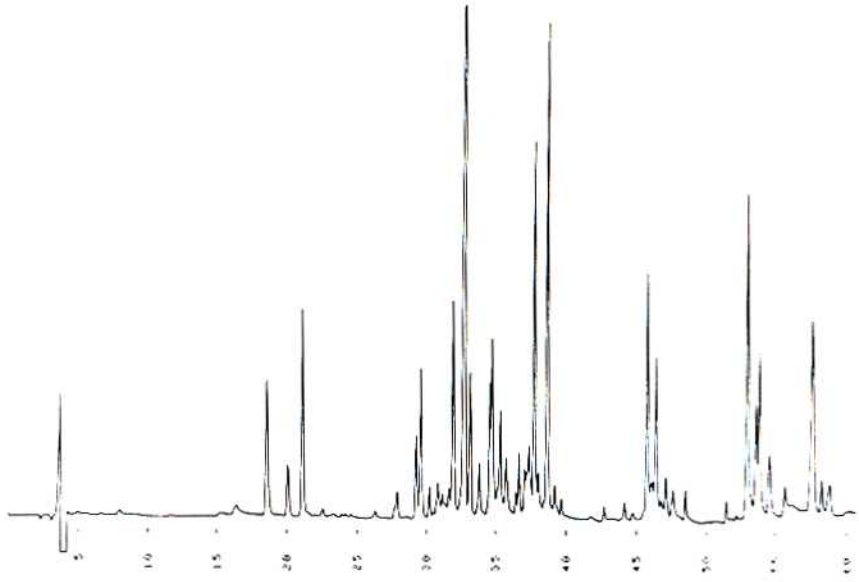

FIG. 5. Mapa tríptico del IFN α-2 recombinante.

La proteína reducida fue fragmentada con TPCK-tripsina a escala preparativa y los péptidos obtenidos fueron separados mediante HPLC-RP. Fueron encontrados catorce péptidos, todos los cuales corresponden a sitios de ruptura específica que fueron secuenciados automáticamente. Los fragmentos secuenciados verifican la estructura primaria de la proteína (figura 6). A partir de la secuenciación automática se demostró que una parte del material se inicia en metionina y otra en cisteína.

Este resultado se verificó a partir de:

1. Se efectuó la secuenciación automática de la proteína intacta en un secuenciador automático (Knauer) identificándose la región del extremo N-terminal hasta el residuo 39. Aquí se encontraron dos secuencias en paralelo, una que empieza en metionina y otra en cisteína.
2. A partir de los péptidos trípticos se aislaron dos péptidos independientes correspondientes a los extremos N-terminales iniciados en metionina y cisteína respectivamente. La secuencia correspondiente a la región del aminoácido 36 al aminoácido 49 fue verificada por espectrometría de masas de las digestiones enzimáticas.

El extremo C-terminal de la digestión tríptica es un aminoácido libre, por lo cual no es posible su verificación a partir de este tipo de digestión. La secuencia del extremo C-terminal fue caracterizada mediante el uso de carboxipeptidasa Y y se estableció la secuencia --- SER-LYS-GLU, que coincide con la esperada.

MET CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY SER ARG ARG THR LEU MET

LEU LEU ALA GLN MET ARG ARG ILE SER LEU PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG

HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU GLU PHE GLY ASN GLN PHE GLN LYS ALA

GLU THR ILE PRO VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE

SER THR LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU THR LEU LEU ASP LYS PHE

TYR THR GLU LEU TYR GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL ILE GLN

GLY VAL GLY VAL THR GLU THR PRO LEU MET LYS GLU ASP SER ILE LEU ALA

VAL ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR LEU LYS GLU LYS LYS TYR

SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG SER PHE SER

LEU SER THR ASN LEU GLN GLU SER LEU ARG SER LYS GLU
*******

FIG. 6. Secuencia aminoacídica del IFN α-2 recombinante.
---------- Péptidos trípticos.
———————— Secuenciación automática sobre la proteína intacta.
•••••••••••• Secuencia C-terminal.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Secuenciación Automática del Instituto de Química Bioorgánica "Shemiakyn" de la Academia de Ciencias de la URSS; a los doctores S. Fischer y F. Reimann, a los señores Knauer de la empresa Knauer (Berlín occidental) y al Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana), por sus valiosas colaboraciones en la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

BODO, G. (1981). "Procedures for large-scale production and partial purification of Hu-IFN from lymphocyte (Namalwa) cultures", en: *Methods in Enzymology* **78** (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press, N.Y. and London, p. 69.

CANTELL, K.; S. HIRVONEN; H.L. KAUPPINEN Y G. MYLLYIA (1981a). "Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of *Sendai* virus", en: *Methods in Enzymology* **78** (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press, New York and London, pp. 29-38.

CANTELL, K; S. HIRVONEN y V. KOISTINEN (1981b). "Partial purification of human leukocyte interferon on a large scale", en: *Methods in Enzymology* **78** (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press, N.Y. and London, pp. 499-505.

DE YOUNG, C.; G.T. RUGHES; E.V. WIERINGER y K.J. WILSON (1982). *Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography.*. J. Chromatogr. **241**: 345-359.

GLAZER, N.; R.J. DELANGE y D.S SIGMAN (1976). "Chemical modification of proteins", en: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. (Eds. T.S. Work y E. Work), North-Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, pp. 15-16, 23, 31.

ISAACS, A. y J. LINDENMANN (1975). *Virus interference. I. The interferon.* Proc. Royal Soc. **147B**: 258-267.

KAMP, R.M. (1986). "Separation of peptides", en: *Advanced Methods In Protein Microsequence Analysis.* (Eds. B. Wittmann-Liebold, J. Salnikov y V.A. Erdmann), Stringer-Verlag, Berlín, Heidelberg, New York, London, París, Tokyo, pp. 8-20.

LEONG, S. y J.S. HOROSZEWICZ (1981). "Production and preparation of Hu (fibroblast) IFN for clinical trials", en: *Methods in Enzymology* **78** (Part A). S. Pestka ed., Ac. Press. N.Y. and London, p. 78.

PESTKA, S. (1981). "Cloning of the human interferons", en: *Methods in Enzymology* **78** (Part B). S. PESTKA ed., Ac. Press. N.Y. and London, pp. 599-601.