Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 72-79 (1990)

Caracterización de la estructura primaria de la interleucina-2 humana recombinante

V. MORERA,[1] M. RICHARDSON,[2] C. MATEO DE ACOSTA,[3] H. MATA,[4] M. ARAÑA,[4] P. LÓPEZ,[4] V. BESADA[1] y L. CASTELLANOS[1]

[1] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

[2] Department of Botany, University of Durham, Durham DH1-3LR, United Kindom

[3] Instituto de Oncología y Radiobiología, 29 y D, Vedado, La Habana, Cuba

[4] Centro de Investigaciones Biológicas, Apartado 6996, La Habana 6, Cuba

Recibido en julio de 1989
Aprobado en septiembre de 1989

RESUMEN

La interleucina-2 humana recombinante clonada y expresada en *E. coli*, y purificada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), fue analizada para verificar su estructura primaria. El análisis de aminoácidos de la proteína pura coincide con la composición teórica esperada. La proteína fue hidrolizada con bromuro de cianógeno, los péptidos separados por HPLC fueron secuenciados automáticamente y determinada su composición aminoacídica, confirmándose la estructura desde el extremo N-terminal hasta el residuo 56.

Con el propósito de completar la secuencia de la proteína, esta fue reducida y carboximetilada. La proteína se sometió a digestión con endoproteinasa GLU-C (*Staphyloccocus aureus* V8) y una parte de esta digestión se incubó a continuación con tripsina. Los péptidos purificados mediante gel filtración (Biogel P-6) y HPLC en fase inversa, fueron secuenciados con la técnica manual de doble acoplamiento con dimetilaminoazobenzeno isotiocianato e isotiocianato de fenilo (DABITC/PITC).

La purificación de la digestión tríptica de la proteína reducida y carboximetilada mediante fase inversa, suministró los péptidos para análisis en espectrometría de masas utilizando como fuente de ionización bombardeo con átomos rápidos (MS FAB).

Tanto los resultados de la secuenciación como la espectrometría de masas confirman que la interleucina-2 obtenida en *E. coli* posee la estructura primaria reportada para esta proteína.

SUMMARY

Human recombinant Interleukin-2 cloned and expressed in *E. coli* and purified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was analyzed so as to verify its amino acid sequence. The amino acid composition corresponds to the expected. The protein was digested with cyanogen bromide. The peptides were isolated by HPLC, sequenced automatically and their aminoacid composition was determined. From CNBr digest it was possible to confirm the structure from the N-terminus to the residue Nr. 56. In order to complete the sequence analysis the protein was reduced and carboxymethylated, followed by Endoproteinase GLU-C digestion. A fraction of this digest was further treated with trypsin. The peptides isolated by gel filtration (Biogel P-6) and RP HPLC were sequenced by manual DABITC-PITC double coupling method and their amino acid composition was determined. Tryptic peptides, purified by RP-HPLC were analyzed by FAB-Mass spectrometry. The results obtained by FAB-Mass spectrometry and sequence analysis confirm the exact structure of Interleukin-2.

INTRODUCCION

La interleucina-2 (IL-2), es un factor inmunomodulador producido por ciertos subgrupos de linfocitos T (Morgan *et al.*,

Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba

1976; Swain *et al.*, 1981). Este factor, o linfoquina, ha sido identificado por su habilidad de promover la proliferación a largo plazo de las células T activadas y la inducción de interferón (Farrar *et al.*, 1981); por esta razón fue llamado originalmente factor de crecimiento de las células T. La clonación del gen de la IL-2 (Taniguchi *et al.*, 1983; Devos *et al.*, 1983) y su expresión a altos niveles en *E. coli* ha dado la posibilidad de producir grandes cantidades de proteína pura, sin residuos de otras linfoquinas naturales, factores de crecimiento o interferones.

Tanto como estos últimos, la IL-2 ha mostrado aumentar la actividad de las células asesinas sugiriendo su uso potencial en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

En el presente trabajo describimos la caracterización de la estructura primaria de la proteína producida en *E. coli*.

MATERIALES Y METODOS

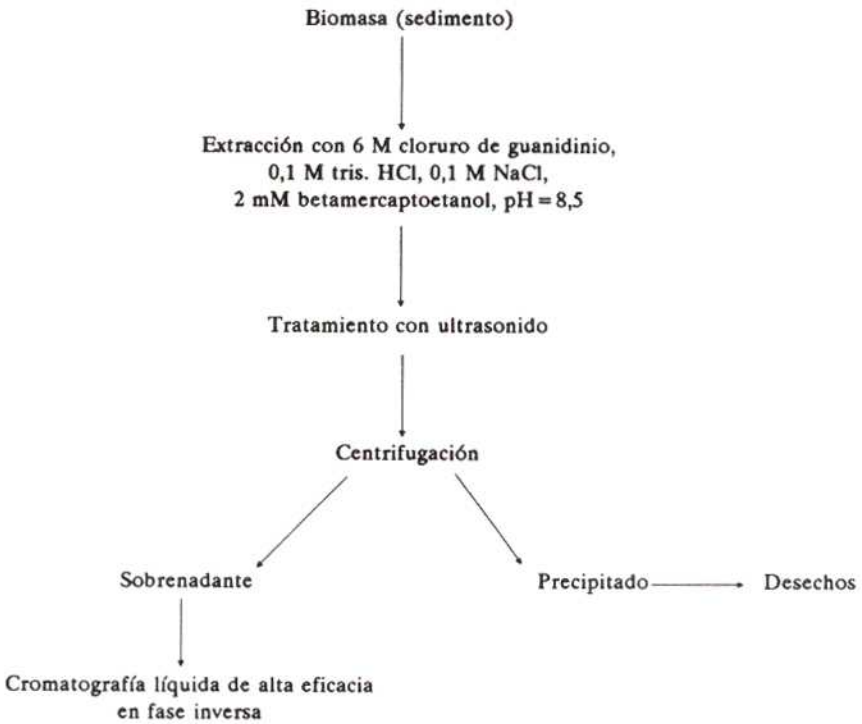
Purificación de la IL-2

La IL-2 humana clonada y expresada en *E. coli* fue extraída del sedimento celular de la biomasa lavada y sometida a un proceso de purificación según el esquema 1.

La proteína pura obtenida de fase inversa fue sometida a hidrólisis ácida (Morera *et al.*, 1989), para determinar su contenido aminoacídico.

Hidrólisis con bromuro de cianógeno. Análisis de los péptidos

La proteína con alto grado de pureza fue hidrolizada con bromuro de cianógeno, utilizando un exceso 300x sobre residuos totales de metionina en 0,1N HCl, en presencia de un agente reductor durante 24 horas, en atmósfera de nitrógeno. La hidrólisis se detuvo añadiendo agua al medio de reacción y concentrando en evaporador rotatorio. El hidrolizado fue separado mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, usando una columna C8 de poro ancho (300 Å) con un gradiente lineal de 0% a 100% de acetonitrilo con 0,1% de ácido



ESQUEMA 1

trifluoroacético en 120 min, con flujo de 0,8 ml/min. Para cada péptido fue determinado su contenido aminoacídico y su espectro de masas. Se estableció la secuencia de cada uno utilizando un secuenciador automático en fase gaseosa APPLIED BIOSYSTEMS 477A-120A.

Análisis por espectrometría de masas

La proteína purificada mediante HPLC en una mezcla de isopropanol/agua fue liofilizada. Posteriormente se redujo en buffer 6 M cloruro de guanidinio, 0,6 M TRIS, pH = 8,6 durante 3 horas con 30 μl de betamercaptoetanol en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió ácido yodoacético en forma de sal de sodio en 1 M NaOH y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. Los excesos de sales y reactivos fueron eliminados por diálisis contra agua. Se ajustó la solución a 0,1 M NH_4HCO_3 y pH = 8,0. Se añadió tripsina en relación E/S = 1/50 y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente, con agitación suave.

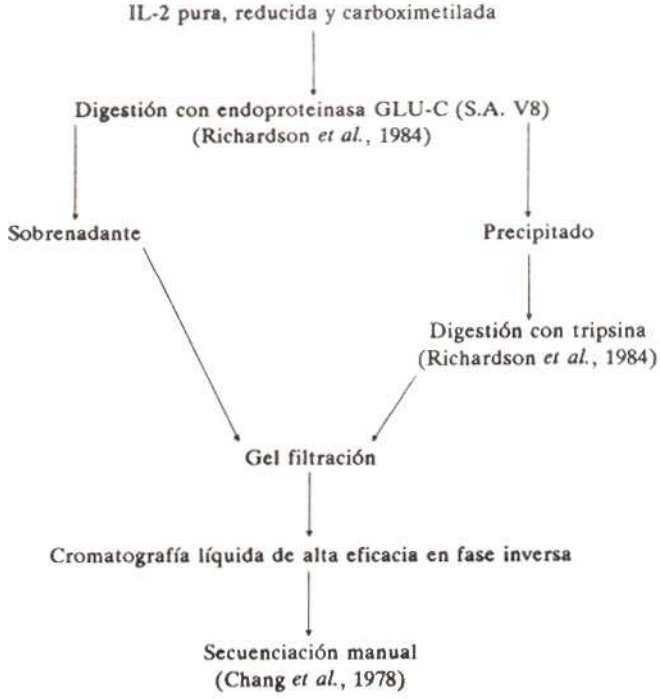
La mezcla se inyectó directamente a una columna C8 WP (300 Å) (BAKER) (25 cm x 4,6 mm) acondicionada a 37°C y se eluyó con un gradiente de 0% a 80% de acetonitrilo con 0,1% de ácido trifluoroacético en 40 min, con flujo de 1 ml/min. La detección se efectuó simultáneamente a 226 nm y 280 nm. Cada fracción obtenida fue analizada mediante espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos.

Secuenciación manual utilizando el método de doble acoplamiento DABITC/PITC

Con el objetivo de completar la secuencia aminoacídica de la proteína, se procedió a la obtención de pequeños péptidos. Con este fin, una alícuota de la proteína fue tratada según el esquema 2.

RESULTADOS Y DISCUSION

La purificación de la IL-2 utilizando cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, permite obtener un preparado con alto grado de pureza y homogeneidad (figura 1). Este resultado se confirma con los datos aportados por el análisis de aminoácidos, en el cual los valores obtenidos son coincidentes con los valores teóricos esperados (tabla 1).



ESQUEMA 2

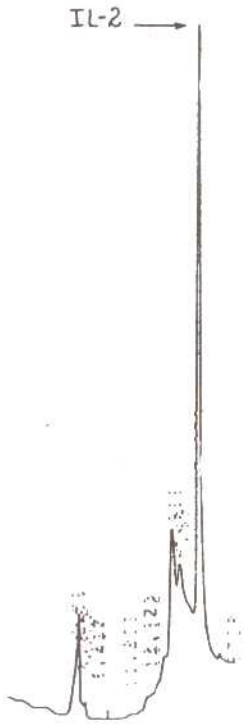


FIG. 1. Perfil cromatográfico de la IL-2 obtenida por cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa.

Tabla 1
RESULTADOS OBTENIDOS DEL ANALISIS DE AMINOACIDOS DE LA IL-2 PURA

AA.	B	T	S	Z	G	A	V	I	L	Y	F	H	K	R
VT.	12	13	8	18	2	5	4	9	22	3	6	3	11	4
VE.	11.9	11.6	7.2	18.0	3.6	5.4	4.2	7.2	22.0	2.7	6.1	3.0	10.3	4.1

VT: valor teórico esperado.
VE: valor experimental obtenido.
AA: código de una letra para los aminoácidos.

La hidrólisis con bromuro de cianógeno suministró los péptidos para el estudio de la estructura primaria de la molécula. Se obtuvieron los cinco péptidos esperados con este tipo de hidrólisis química. Los péptidos correspondientes a la región C-terminal del residuo 45 al residuo 133 coeluyen en fase inversa y su recobrado es muy bajo. A causa de su naturaleza hidrofóbica, existe la posibilidad de que esta región se enlace muy fuertemente a la matriz de la columna. La composición aminoacídica de los péptidos C1, C2, C3 y C4 corresponde a los péptidos esperados para este tipo de hidrólisis (tabla 2).

La degradación automática de Edman de los péptidos C1, C2, C3 y C4, permitió verificar la secuencia desde el extremo N-terminal hasta el residuo 56 y del residuo 105 al residuo 114 (tabla 3).

Tabla 3
RESULTADOS DE LA SECUENCIACION AUTOMATICA DE C1, C2, C3 Y C4

Péptido	C1	C2	C3	C4
Ciclos	Secuencia			
1	A	I	L	P, –
2	P	L	T	K, E
3	T	N	F	K, Y
4	S	G	K	A, A
5	S	I	F	T, D
6	S	N	Y	E, E
7	T	N	M	L, T
8	K	Y		K, A
9	K	K		H, T
10	T	N		L, I
11	Q	P		
12	L	K		
13	Q	L		
14	L	T		
15	E	R		
16	H	M		
17	L			
18	L			
19	L			
20	D			
21	L			
22	Q			
23	M			

Tabla 4
ANALISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS DE C1, C2, C3 Y C4

Péptido	Masa	Secuencia
C1	2 535.4	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQM
C2	1 842.0	ILNGINNYKNPKLTRM
C3	901.5	LTFKFYM
C4	10 060.2	PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR-
		DLISNINVIVLELKGSETTFM
		CEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

Tabla 5
ANALISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS DE LOS PEPTIDOS TRIPTICOS

Péptido	Masa	Secuencia
T9	561.5	KATELK
T10	689.1	ATELK
T1	909.4	MAPTSSSTK
T2	1037.4	MAPTSSSTKK
T8	685.2	FYMPK
T13	686.4	NFHLR
T7	639.1	MLTFK
T11	2621.8	HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK
T15	2686.1	GSETTFMCEYADETATIVEFLNR
T16	1570.9	WITFCQSIISTLT
T12	1341.1	PLEEVLNLAQSK
T14	1583.0	DLISNINVIVLELK
T4	2725.6	TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK
T3	2854.7	KTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK
T5	3066.2	TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK

M A P T S S S T K K T Q L Q L E H L L L D L

Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K

F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P

L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S

N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D

E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T

L T

FIG. 2. **Resultados de la secuenciación manual de la IL-2.**

La reducción y carboximetilación no solamente favorece el desplegamiento de la proteína y la hace más asequible a la ruptura enzimática, sino que también genera un derivado de la cisteína marcado, que permite una conveniente determinación del recobrado de la proteína y una mejor cuantificación durante el análisis de aminoácidos.

Tanto los resultados de la secuenciación como la espectrometría de masas, confirman que la interleucina-2 obtenida en *E. coli* posee la estructura primaria reportada para esta proteína.

REFERENCIAS

CHANG, J. Y.; D. BRAUER y B. WITTMANN-LIEBOLD (1978). *Microsequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-*dimethylaminoazobenzene *4'-isothiocyanate/ phenylisothiocyanate double coupling method.* Febs Letters **93**: 205-214.

DEVOS, R.; G. PLAETINCK; H. CHEROUTRE; G. SIMONS; W. DEGRAVE; J. TAVERNIER; E. REMAUT y W. FIERS (1983). *Molecular cloning of human interleukin-2 cDNA and its expression in* E. coli. Nucleic Acids Research **11**: 4307-4323.

FARRAR, W. L.; H. M. JOHNSON y J. J. FARRAR (1981). *Regulation of the production of Inmune Interferon and cytotoxic T lymphocytes by Interleukin 2.* J. Immunol. **126**: 1120-1125.

MORERA, V.; I. NAZIMOV; V. CHEMYAKIN y L. CASTELLANOS (1989). *Caracterización química del interferón alfa-2 humano recombinante.* Interferón y Biotecnología **6**: 41-45.

MORGAN, D. A.; F. W. RUSSETTI y R. GALLO (1976). *Selective* in vitro *Growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.* Sci. **193**: 1007-1008.

RICHARDSON, M.; F. D. A. CAMPOS; R. A. MOREIRA; I. L. AINOUZ; R. BEGBIE; W. B. WATT y A. PUSZTAI (1984). *The complete aminoacid sequence of the major subunit of the lectin from the seeds of* Dioclea grandiflora (Mart). Eur. J. Biochem. **144**: 101-111.

TANIGUCHI, T.; H. MATSUI; T. FUJITA; CH. TAKAOKA; N. KASHIMA; R. YOSHIMOTO y J. HAMURO (1983). *Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.* Nature **302**: 305-310.

SWAIN, S. L.; G. DENNERT; J. F. WARNER y R. W. DUTTON (1981). *Culture supernatants of a stimulated T-cell line have helper activity that acts synergistically with interleukin-2 in the response of B cells to antigen.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 2517-2521.