

Estudio de los factores que afectan la expresión de la interleucina-2 humana en *Escherichia coli* bajo el control del promotor triptófano

M. VEGA¹, M. A. TUÑÓN¹, M. ARAÑA², H. MATA² y M. QUINTANA¹.

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

² Centro de Investigaciones Biológicas, Apartado 6996, Habana 6, Cuba

Recibido en octubre de 1990

Aprobado en abril de 1991

RESUMEN

Con el objetivo de incrementar la expresión de la interleucina-2 humana recombinante (IL-2 hum. rec.) producida en *Escherichia coli* bajo el control del promotor triptófano se estudiaron diversos factores, incluyendo aquellos relacionados con el sistema de inducción. Se alcanzaron niveles de expresión de IL-2 hum. rec. superiores a 120 mg/l de cultivo después de escalar el proceso fermentativo hasta 50 litros de volumen efectivo.

La proteína fue sintetizada en forma insoluble formando cuerpos de inclusión. Se empleó un proceso de lavado celular obteniéndose una preparación con 70 % de pureza y demostrándose la identidad de la proteína mediante análisis de *Western blot*.

SUMMARY

To improve the expression of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli* under the control of triptophan promoter, some factors, including those related to the induction system, were studied. Expression levels of recombinant human interleukin-2 up to 120 mg/liter of culture were reached in 50 liters working volume fermenters.

The protein was synthesized as insoluble form, forming inclusion bodies. A cell washing process was carried out, accomplishing a preparation with 70 % of purity. The identity of the molecule was showed by *Western blot* analysis.

INTRODUCCION

La IL-2 humana constituye el eje de las linfocinas por su respuesta inmune (Robb, 1984). Por su capacidad de identificar productos de células oncógenas permite descubrir la causa de incontrolables proliferaciones como el cáncer. Dicho gen ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli* (*E. coli*) por varios grupos (Taniguchi, 1983; Devos *et al.*, 1983), reportándose experiencias comparativas de IL-2 obtenida por vía natural y recombinante donde no se han observado diferencias en la actividad biológica de ambas (Nauro *et al.*, 1985).

Entre los factores que afectan la expresión de un gen clonado se encuentran el tipo de promotor, secuencia de bases vecinas al sitio de enlace con el ribosoma, número de copias del plasmidio, presencia de terminadores de la transcripción, tipo de hospedero y condiciones fisiológicas de crecimiento (Glick y Whitney, 1987).

En este trabajo se analizan los factores que influyen en el proceso de obtención de la IL-2 hum. rec. y su escalado hasta 50 litros de fermentación. Además se estudia

el posterior lavado de la biomasa celular obtenida.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó la *E. coli* K-12. Se emplearon las siguientes fuentes bacterianas:

- LE 392: F⁺, supF, supE, hsdR, gal K₂, tripR, metB1, lacY1 tonA(r_k⁻, m_k⁺). (BRL GIBCO, 1985-1986.)

- JM 101: lac, pro supE, thi(r_k⁺, m_k⁺)/[F' tra D36 pro AB lac]^q Z M15. (BRL GIBCO, 1985-1986.)

- JA 221: Hfr; Trip E5, leu B6; lac y; rec A; thi⁻ hsd M⁺ hsdR⁻.

- W 3110: F⁻. (Hill y Harnish, 1982)

- C 600: F⁻, thi⁻¹, thr⁻¹, leu B6, lac Y1, tonA21, supE, hsdM⁺(mcrA⁻, mcrB⁺), hsdR⁻, hsdM⁺.

- HB 101: F⁻, hsd S₂₀(r_B⁻, m_B⁻), supE44, ara⁻¹⁴, gal K₂, lacY1, proA2, rpsL20 (str), xyL5, mtl1, rec A13, (mcrA⁺ mcrB⁻), dam⁺. (BRL GIBCO, 1985-1986)

Plasmidio

Se utilizó el plasmidio pCB 1030, que contiene el gen que codifica para la expresión de la IL-2 humana regulado bajo el control del promotor triptófano y presenta el gen que codifica para la β lactamasa.

Condiciones de cultivo

Las células de inóculo se crecieron en tubos con 5 ml de medio Luria broth, LB (Miller, 1972) suplementado con ampicilina y triptófano, 50 y 100 ug/ml respectivamente. El cultivo fue mantenido durante 14 horas a 37°C.

Para realizar los experimentos de selección de la cepa hospedera, se tomaron las células del inóculo y se hicieron crecer en medio mínimo M9 (Miller, 1972) enriquecido con hidrolizado de caseína (L41, OXOID, Inglaterra) al 2 % y 1,5 ml/l de solución de microelementos (Reiling *et al.*, 1985) autoclaveados a 1 atm durante 15 minutos. En otros experimentos se empleó medio mínimo Mn (Reiling *et al.*, 1985) con los mismos aditivos para enriquecerlo. Además se añadió a ambos medios 1 ml/l de CaCl₂ 0,01 M y de MgSO₄·7H₂O 0,1 M. En estos medios se garantiza la ausencia de triptófano, para provocar la inducción del sistema (Yanofski *et al.*, 1981).

Las condiciones de crecimiento en zaranda fueron: relación de volumen efectivo / volumen total: 1/5, 240 rpm y 37°C.

El análisis del sistema de inducción se realizó con las mismas condiciones de cultivo, y con las cepas que mostraron los mejores resultados.

El L-triptófano utilizado se esterilizó por filtración, mientras que el ácido 3 β indolacrílico (concentración en el cultivo 20 μ g/ml), se preparó al momento a 20 mg/ml en etanol.

Las condiciones de fermentación en 1,5 litros de volumen efectivo (fermentadores Marubishi, Japón) fueron 37°C, 1 vvm de aereación y 350 rpm de agitación; las mismas se mantuvieron constantes al aumentar el volumen de fermentación.

Lavado celular

Las células fueron colectadas por centrifugación y sometidas a un proceso de lavado celular realizado a una concentración de 0,1 g de biomasa húmeda por ml de solución salina (Tris.HCl 10 mM, EDTA 0,2 mM, pH 7,2). Como parte de este proceso, las células se tratan con detergente (Tritón X 100) y urea 4M para eliminar contaminantes; además, se somete a un proceso de ruptura enzimática con lisozima (concentración final 2 mg/ml). La suspensión fue homogeneizada con un politrón (IKA; RFA) y centrifugada a 7500 rpm.

Todo el proceso se realizó a 4°C.

Determinaciones analíticas.

El crecimiento celular fue medido en un fotocolorímetro (ERMA OPTICAL WORK, LTD, Japón) a 530 nm y expresado en la unidad absorbancia o densidad óptica (D.O.). La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de dodecil- sulfato de sodio (SDS) (Laemmli, 1970).

Se utilizó como patrón de peso molecular la lisozima (PM 14 400 dalton) efectuándose la evaluación de los resultados por densitometría (densitómetro GS 350 USA). La cantidad total de proteína se midió según Lowry *et al.* (1951). El *Western blot* se realizó según Burnette (1981) y la microscopia según Spurr (1969).

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de las cepas transformadas.

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos y se observa que con las cepas HB 101 y C 600 se obtuvo una disminución de la cantidad de IL-2 (mg/l) producida

a las 24 horas después de la inducción con respecto a las 12 horas, no ocurriendo así con el resto de las cepas estudiadas. Una de las de mayor producción es la W 3110, alcanzándose la mayor cantidad de IL-2 hum. rec. a las 12 horas con la cepa C 600. Se tomaron dichas cepas como hospederos para proseguir los experimentos.

Se utilizó como método de inducción la ausencia de triptófano en el medio de cultivo.

variables la fuente de carbono (glucosa 0,4 % y glicerol 2 %), la adición o no de microelementos al medio de cultivo, la cepa bacteriana (W 3110 y C 600) y el tipo de medio de cultivo salino empleado (Mn y M9). Una vez realizadas todas las variantes se evaluó en cada una de ellas la cantidad de IL-2 hum. rec. obtenida (mg/l).*

Del análisis de los resultados se obtuvo que el empleo del glicerol 2% como fuente de carbono y la cepa *E. coli* C 600 como

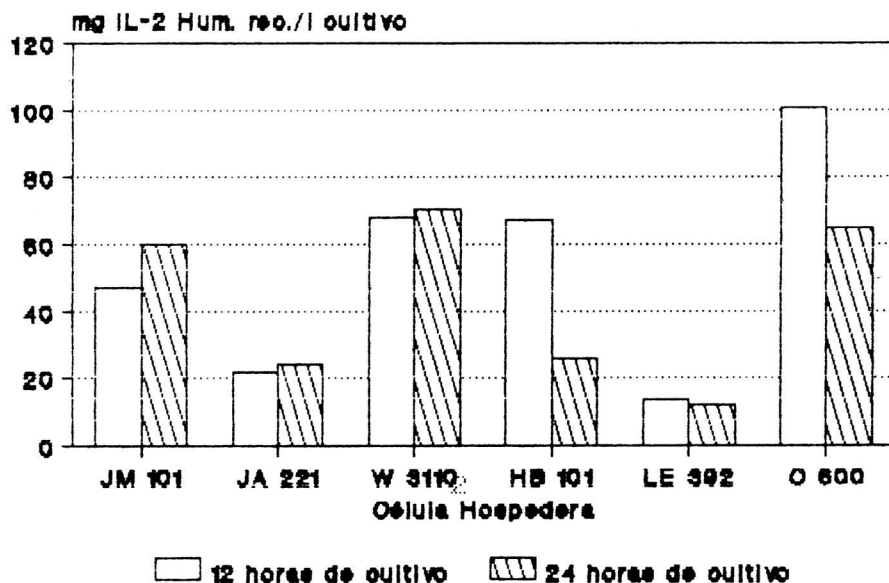


FIG. 1. Niveles de expresión de la IL-2 hum. rec. en distintas cepas de *E. coli*. (12 horas de cultivo en zaranda, 240 rpm, 37°C, medio M9 + hidrolizado de caseína. Volumen de cultivo: 200 ml).

Selección del medio de cultivo y la célula hospedero

Para la selección del medio de cultivo y la célula hospedero adecuada para la producción de IL-2 hum. rec. se aplicó un diseño factorial según Pérez Bolaño y Herrera (1981). Se estudiaron como

hospedero, influyen positivamente en la obtención de la proteína, mientras que la adición o no de los microelementos y el tipo de medio salino no influyen. A las 24 horas fueron significativas las mismas variables; en la tabla 1 se observan las mejores variantes experimentales seleccionándose un tiempo de 12 horas de fermentación.

* Datos no mostrados.

Tabla 1
MEJORES VARIANTES DEL DISEÑO FACTORIAL 2⁴

Medio empleado para las variantes	12 horas de cultivo	24 horas de cultivo
Glicerol, no mic, C 600, M9	134,32	115,40
Glicerol, si mic, C 600, M9	67,04	126,90
Glicerol, no mic, C 600, Mn	136,50	120,00
Glicerol, no mic, C 600, Mn	107,95	120,65

Nota:

No mic.: No se añadieron microelementos al medio de cultivo.

Si mic.: Se añadieron microelementos al medio de cultivo.

C 600: Cepa utilizada.

M9: Contenido de sales del medio de cultivo, según Miller (1972).

Mn: Composición de sales del medio según Reiling *et al.* (1985).

Los datos están expresados en mg de IL-2 hum. rec. / litro de cultivo. La cantidad en mg de IL-2 hum. rec. / litro de cultivo está calculada por la multiplicación del % de pureza, evaluado por densitometría por la cantidad total de proteína de la muestra que se aplicó en la electroforesis.

Estudio del sistema de inducción

Yanofsky *et al.* (1981), plantea que el operón *trp* se induce con un medio libre de triptófano, lo que ha sido corroborado por otros autores (Devos *et al.*, 1983; Morales *et al.*, 1989; Campos *et al.*, 1990). Por otra parte Shimizo *et al.* (1987) utilizando el ácido 3 β indolacrílico como inductor del sistema ha obtenido una disminución del número de células viables y la inhibición de la síntesis de proteínas. Sin embargo, en algunas construcciones genéticas utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes bajo dicho promotor es necesario añadir ácido 3 β indolacrílico (15 - 20 $\mu\text{g/ml}$) para la inducción del mismo (Mizukami *et al.*, 1986).

a)- Efecto de la concentración de triptófano. Para conocer la concentración de triptófano en donde se puede obtener la mayor cantidad de la proteína de interés, se añadieron al medio de cultivo desde 0 hasta 150 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano, analizando su

efecto en el nivel de expresión de la IL-2 hum. rec. en la cepa *E. coli* C 600.

En la figura 2 se observa que al existir mayores concentraciones de triptófano en el medio de cultivo, la expresión de IL-2 hum. rec. es menor, mientras que para concentraciones entre 0 y 30 $\mu\text{g/ml}$ se obtienen las mayores cantidades de proteína. Se tomaron 5 $\mu\text{g/ml}$ para los medios de cultivo en los procesos de obtención de la proteína y en el medio del inóculo 100 $\mu\text{g/ml}$.

b)- Inducción por adición de ácido 3 β indolacrílico. La adición del inductor se probó en diferentes fases de crecimiento del microorganismo. Se efectúa el análisis 12 horas después de realizada la adición.

En la figura 3 se observa que la densidad óptica a la cual se añade el inductor, no influye significativamente, por lo que es posible realizar la inducción en cualquier fase del crecimiento celular.

Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos al realizar la

inducción por disminución de la concentración de triptófano en el medio, se observan mejores resultados con este último

método (110 mg/l para una concentración de triptófano de 5 $\mu\text{g/ml}$) según se representa en la figura 2.*

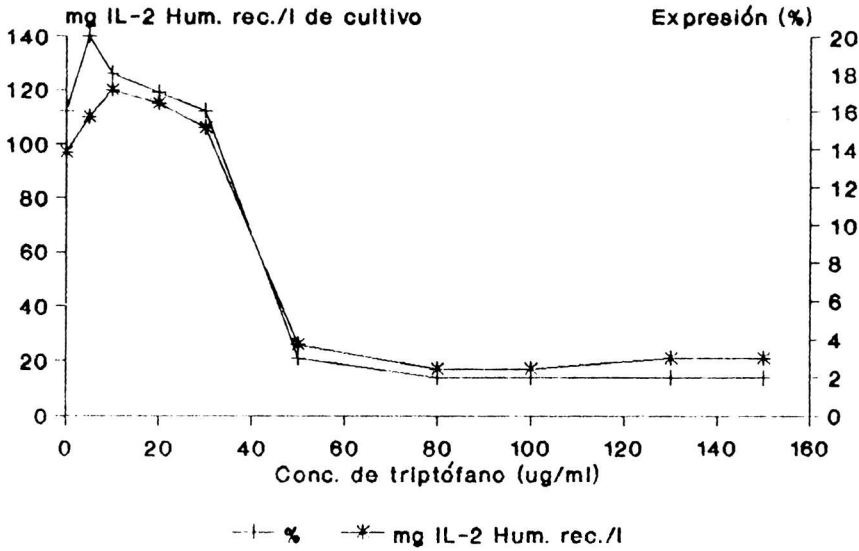


FIG. 2. Resultados promedios de varios experimentos realizados para demostrar el efecto de la adición de triptófano sobre la expresión de la IL-2 hum. rec.

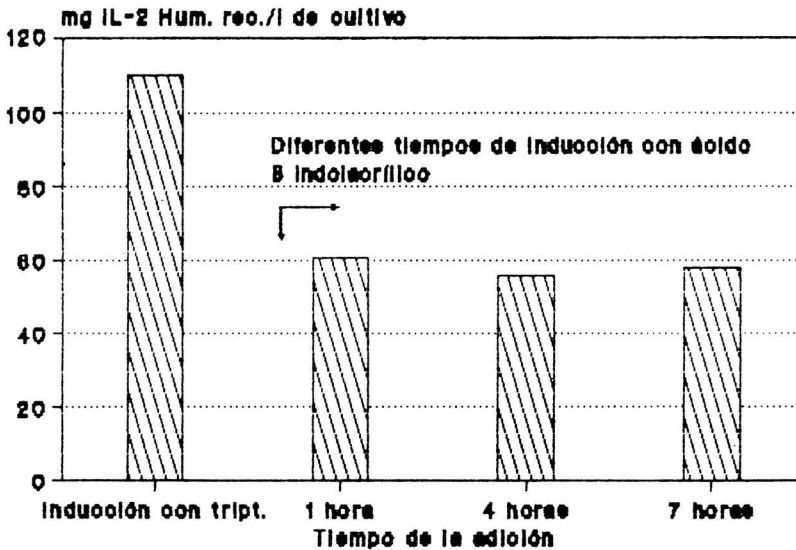


FIG. 3. Efecto de la inducción con ácido β -indolacrílico en distintas etapas del crecimiento celular. Experimento realizado en zaranda 240 rpm, 37°C, medio M9 + hidrolizado de caseína.

* Datos no mostrados.

Determinación de algunas de las condiciones de fermentación

Se estudiaron variables como el pH, la temperatura y el tiempo de fermentación, siguiendo el mismo procedimiento que para seleccionar la cepa hospedera. Se obtuvieron los mejores resultados fermentando a 37°C durante 12 horas, manteniendo el pH del medio en 5,5 unidades.*

Con estas condiciones se realizó el escalado del proceso fermentativo hasta 50 litros de volumen de cultivo (tabla 2) en el cual, a pesar de que se mantiene la concentración de IL-2 hum. rec., al relacionarla con la densidad óptica del

cultivo dicho parámetro disminuye; esto puede estar influido por haber mantenido las mismas condiciones de agitación y aereación en las tres etapas fermentativas, pues según Ryan *et al.* (1989), bajos niveles de sustratos críticos como oxígeno disuelto en el medio de cultivo, alteran el estado metabólico de la célula de *E. coli*.

Escalado del proceso de lavado celular.

Según se observa en la figura 4, la IL-2 hum. rec. aparece en la célula en forma de cuerpo de inclusión, por lo que se realizó un proceso de lavado celular, el cual fue chequeado por electroforesis.

Tabla 2
RESULTADOS DEL ESCALADO DEL PROCESO FERMENTATIVO

	1,5 litros	5 litros	50 litros
Dens. Opt. Final	4	5	8
% expresión IL-2	23	19	13
Conc. IL-2 (mg/l)	150	130	160
Conc. IL-2/D. Opt.	37	26	20

Nota:

Dens. Opt. Final: Es la densidad óptica del cultivo al final del proceso fermentativo

% expresión IL-2: Es la relación expresada en % que existe entre la cantidad de IL-2 hum. rec. y de proteína total. Este valor se obtiene del análisis por densitometría.

Conc. IL-2 (mg/l): Es la cantidad de IL-2 hum. rec. expresada en mg que está presente en un litro de cultivo. Se calcula multiplicando la cantidad de proteína total de un litro de cultivo por el por ciento de expresión.

Conc IL-2/D. Opt.: Es el resultado de dividir la concentración de IL-2 por la densidad óptica.

* Datos no mostrados

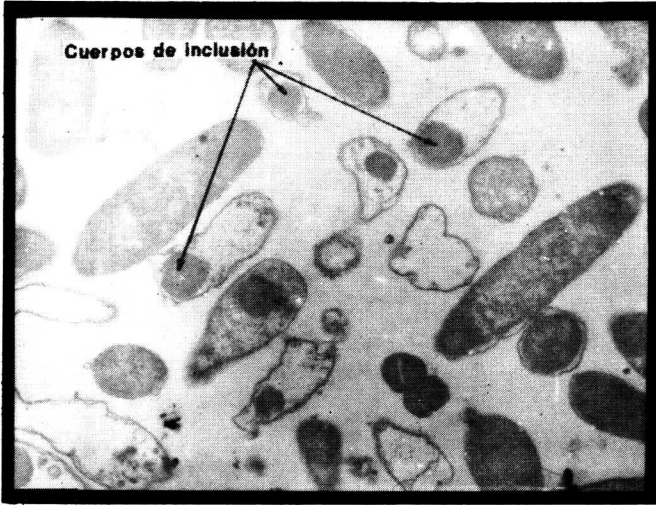


FIG. 4. Micrografía electrónica de transmisión de células (W 3110 + I 1030) en fase logarítmica de crecimiento, después de la inducción.

La pureza de la preparación obtenida después de cada lavado y la cantidad de IL-2 hum. rec. que se pierde fue evaluada por densitometría de dichos geles.

La proteína de interés fue completamente insoluble en las soluciones y detergentes utilizados no detectándose en los sobrenadantes de cada lavado (figura 5).

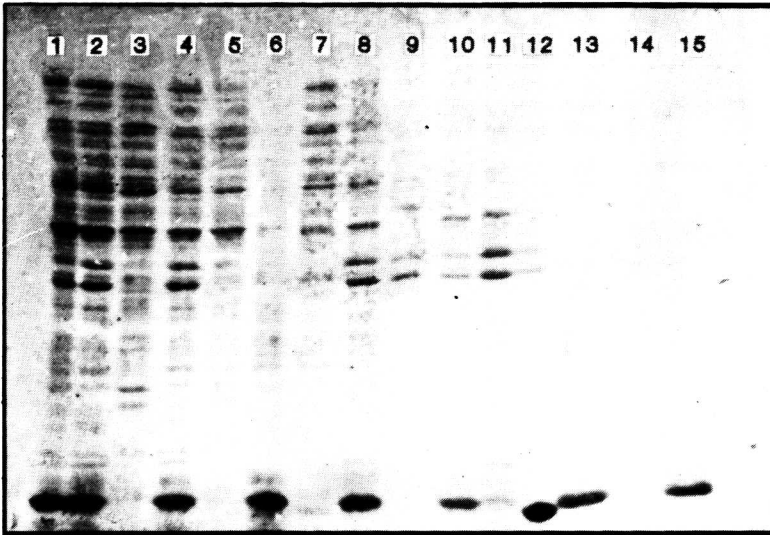


FIG. 5. Gel de poliacrilamida al 15% de la electroforesis realizada a las muestras de 20 μ g de proteína de sobrenadantes y sedimentos del proceso de lavado celular: 1. Biomasa; 2. Sedimento de lavado 1; 3. Sobrenadante del lavado 1; 4. Sedimento del lavado 2; 5. Sobrenadante del lavado 2; 6. Sedimento del lavado 3; 7. Sobrenadante del lavado 3; 8. Sedimento del lavado 4; 9. Sobrenadante del lavado 4; 10. Sedimento del lavado 5; 11. Sobrenadante del lavado 5; 12. Lisozima como patrón de peso molecular (PM-14400 Da); 13. Sedimento del lavado 6; 14. Sobrenadante del lavado 6; 15. Sedimento del lavado 6.

Tabla 3
RESULTADOS DEL ESCALADO DEL PROCESO DE LAVADO CELULAR

Cantidad de biomasa húmeda	% de pureza prep. final	Recobrado IL-2%	Veces purificada
10 gramos	70	85	4,12
30 gramos	73	68	4,40
50 gramos	69	68	5,25

Nota:

% pureza del prep. final: Es la cantidad de IL-2 expresada como % del total de proteínas presentes en la preparación lavada. Se determina directamente por densitometría.

Recobrado IL-2, %: Es la relación entre la IL-2 hum. rec. obtenida al final del proceso de lavado celular con respecto a la que había en la biomasa húmeda antes de dicho proceso, expresada en %.

Veces purificada: resulta de dividir el % de pureza de la preparación final por el % que representaba la IL-2 hum. rec. en la biomasa húmeda, que coincide con el % de expresión.

En este caso se debe tener en cuenta, que las diferentes cantidades de biomasa proceden de volúmenes diferentes de fermentación, los cuales están plasmados en la tabla 2.

Al final del proceso se recobra el 80% del total de la proteína de interés, la cual representa más del 70 % del total de proteínas del preparado final. Este proceso fue escalado hasta cantidades de 50 gramos de biomasa húmeda (tabla 3).

En el *Western blot* mostrado en la figura 6, se observan tres bandas diferentes que son reconocidas por el anticuerpo anti-IL-2. Tomando como base a los pesos moleculares, la banda mayoritaria (alrededor de 15 000 dalton), corresponde al monómero de la molécula y las restantes a sus dímeros y oligómeros. Esto demuestra que la molécula obtenida no es estable en su forma monomérica, ya sea porque el sistema de soluciones en que se encuentra no favorece este estado, o porque las condiciones empleadas para solubilizar la molécula y llevarla a su estructura nativa no son las mejores. El mismo problema ha sido anteriormente reportado por otros autores (Weir y Sparks, 1987).

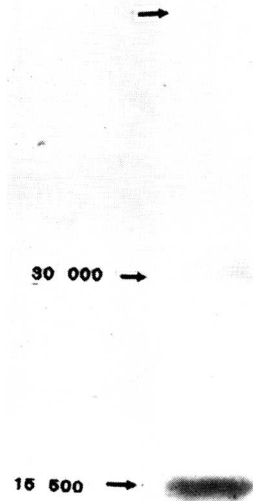


FIG. 6. *Western blot* realizado con el anticuerpo monoclonal CB-IL2.3 específico para la IL-2 hum. rec. con el objetivo de demostrar la autenticidad de la molécula.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. C. Santizo, del CIGB, por su valiosa colaboración en la microscopia electrónica y la realización de las fotos.

REFERENCIAS

- BURNETTE, W.N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein. *A. Analyt. Biochem.* **112**: 195-203.
- CAMPOS, M.; M.P. ESTRADA; R. RUBIERA; O. HERNANDEZ; R. LLEONART; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1990). Bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* K-12 thioredoxin: cloning and high-level expression. *Biotechnology Aplicada* **7**: 313-319.
- DEVOS, R.; G. PLAETINCK; H. CHEROUTRE; G. SIMONS; W. DEGRAVEW; J. TAVERNIER; E. REMAUT y W. FIERIS (1983). Molecular cloning of human interleukin cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **11**: 4307.
- GLICK, B.R. y T.K. WHITNEY (1987). Factors affecting the expression of foreign proteins in *E. coli*. *Journal of Industrial Microbiology* **1**: 277-282.
- HILL, C.W. y B.W. HARNISH (1982). Transposition of a chromosomal segment bounded by redundant rRNA genes in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **149**: 449-457.
- LAEMMLY, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH; A.L. FARR y R.J. RANDAL (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-269.
- MILLER, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY: 431.
- MIZUKAMI, T.; T. OKA y S. ITOH (1986). Production of active human interferon in *E. coli*, optimal condition for induced synthesis by 3 β indolacrylic acid. *Biotechnology Letters* **8**: 611-614.
- MORALES, J.; V. MUZIO; I. TORRENS; V. JIMENEZ; A. SILVA; A. SANTOS; Y. QUIÑONES; E. NARCIANDI y L. HERRERA (1989). Expresión del gen de la proquimosina en *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* **6**: 242-250.
- NAURO, K.; S. HINUMA; K. KATO; M. KOYAMA; H. TADA; U. SHITO y Y. TSUKAMOTO (1985). Comparation of the biological properties of purified natural and recombinant human interleukin-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **128**: 257-264.
- PEREZ BOLAÑO, C. y L. HERRERA (1981). Preliminary genetic study in *Candida utilis*. *Experimental Micrology* **5**: 15-22.
- REILING, H.E.; H. LAURELA y A. FIECHTER (1985). Mass culture of *E. coli*; medium development for low and high density cultivation of *E. coli* b/r in minimal and complex media. *Journal of Biotechnology* **2**: 191-206.
- ROBB, R.J.; R.M. KUTNY; M. PANICO; H.R. MORRIS y V. CHOWDHRY (1984). Amino acid sequence and postranslational modification of human interleukin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6486-6490.
- RYAN, W.; S.J. PARULEKAR y B.C. STARK (1989). Expression of β -lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes. Effects of pH, phosphate and dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioengineering* **34**: 309-319.
- SHIMIZU, N.; S. FUKUZONO; N. NISHIMURA; Y. ODAWARA y K. FUJIWARA (1987). Cultivation of *Escherichia coli* Harboring Hybrid Plasmids. *J. Ferment. Technol.* **65**: 7-11.
- SPURR, A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Research* **26**: 31-36.
- TANIGUCHI, T.; H. MATSUI; T. FUJITA; C. TAKAOKA; R. YOSHIMOTO y Y. HAMURO (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* **302**: 305-310.
- WEIR, M.P. y J. SPARKS (1987). Purification and renaturation of recombinant human interleukin-2. *Biochem J.* **245**: 85-91.
- YANOFSKI, C.; T. PLATT; I.P. CRAWFORD; B.P. NICHOLS; G.E. CHRISTIE; H. HOROWITZ; VAN CLEEMPert y A.M. WRI (1981). The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **9**: 6647-6668.