

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE SISTEMAS DE
EXPRESION DE MATERIAL GENETICO

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.
UNIDAD ACADEMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO / CCH
UNAM

Tesis que presenta Paulina Balbás Diez Barroso
para la obtención del grado de Maestro en
Investigación Biomédica Básica

México, 1984.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE DE MATERIAS

<u>CAPITULO</u> 1	INTRODUCCION Y OBJETIVO	1
	Factores que afectan los niveles de biosíntesis de una proteína.....	4
	1) Factores transcripcionales	4
	2) factores traduccionales	11
	Diseño de un sistema de expresión de DNA	14
	Objetivo.....	17
<u>CAPITULO</u> 2	EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS CADENAS A Y B DE INSULINA HUMANA	18
	1) Expresión de los genes sintéticos a partir del promotor lacUV5 en forma de proteínas híbridas con beta-galactosidasa	26
	- Resultados	30
	- Conclusiones	47
	2) Expresión de los genes sintéticos en forma de proteínas de fusión con transacetilasa de cloran- fenicol a partir del promotor de trp	49
	- Resultados	58
	- Conclusiones.....	78

<u>CAPITULO</u>	3	EXPRESION DEL cDNA QUE CODIFICA PARA UN INTERFERON HUMANO	85
		Clonación y caracterización del gene que codifica para el interferón leucocitario A.....	88
		- Resultados	92
		- Conclusiones	101
<u>CAPITULO</u>	4	DISCUSION	103
<u>CAPITULO</u>	5	MATERIALES Y METODOS.....	119
<u>REFERENCIAS</u>			122

CAPITULO 1

INTRODUCCION Y OBJETIVO

La ingeniería genética es el término popular con el que se conocen las metodologías de recombinación IN VITRO de ácidos nucleicos y son actualmente las herramientas más poderosas para poder resolver la estructura, organización y regulación del genoma. Además del extenso conocimiento básico que se ha generado gracias al desarrollo de estas metodologías, se han abierto las puertas a la creación de nuevas fuentes de obtención de proteínas. Podemos encontrar en la Naturaleza muchas proteínas de interés biológico en cantidades reducidas. Una de las metas de los tecnólogos en DNA recombinante fue la de modificar el programa genético de los seres vivos con el fin de obtener dichos polipéptidos en cantidades elevadas, tiempos relativamente cortos y a costos bajos (67).

La variedad actual de técnicas de ingeniería genética ha abierto la posibilidad de clonar casi cualquier gene de interés para la salud humana o animal, así como genes de interés para la industria y la agricultura. Una vez que un gene ha sido clonado, el reto es lograr un nivel de expresión elevado ya sea en un huésped homólogo o heterólogo

(9). Es en este sentido, que se han desarrollado sistemas diversos de expresión de material genético. Estos tienen dos componentes básicos:

1) El huésped que llevará a cabo la biosíntesis de las proteínas de interés.

2) El DNA en el que esta codificada la información que dirige la síntesis de péptidos.

La elección del huésped se lleva a cabo de acuerdo con los objetivos finales del investigador, ya que cada especie (procariote o eucariote) presenta características particulares. El presente trabajo forma parte de un proyecto mas amplio que tiene como objetivo final el desarrollo de sistemas que permitan la obtención de péptidos de una manera eficiente, por lo que se requiere un huésped fácilmente cultivable y de rápido crecimiento y reproducción. El huésped elegido fue la bacteria gram-negativa Escherichia coli, no solo porque presenta las ventajas arriba mencionadas, sino porque es la bacteria cuya fisiología y genética es mejor conocida. La disponibilidad de suficientes conocimientos básicos para entender las señales principales que determinan la eficiencia de transcripción del material genético y aquellas que afectan los procesos post-transcripcionales, la han hecho un buen candidato para la biosíntesis de proteínas con fines biotecnológicos, ya que se puede dirigir el diseño de la información genética

que va a ser introducida hacia la optimización de la expresión de genes. Además existe una amplia gama de cepas con características específicas que aumentan las posibilidades de manejo del sistema. Es este conjunto de características sin duda, lo que ha hecho de E. coli el huésped mas utilizado.

La expresión de genes eucariotes en E. coli fue lograda por primera vez cuando se descubrió que genes de levadura clonados en el plásmido ColE1 eran capaces de complementar mutantes auxotróficas de E. coli (92, 103). La expresión de estos genes heterólogos fue originalmente un evento fortuito y no el resultado de la manipulación de señales de transcripción y traducción de E. coli. Desde entonces, nuestra capacidad de manipular secuencias de DNA IN VITRO nos ha permitido una definición mas exacta de las señales de control de E. coli y su utilización para obtener elevados niveles de expresión de genes clonados (9).

El primer sistema de expresión utilizado en E. coli fue el promotor del operón de lactosa (lac) y las secuencias eucarióticas fueron expresadas como proteínas de fusión con beta-galactosidasa (50). Posteriormente se logró la expresión directa de un gene eucariotico que codifica para la hormona del crecimiento humana sin la necesidad del líder de beta-galactosidasa (32). La técnica de expresión directa no es útil para todos los genes, ya que proteínas extrañas de bajo peso molecular son normalmente degradadas en la

bacteria (50). Desde ese momento se han estudiado los factores que afectan los niveles de biosíntesis de proteínas heterólogas, encontrándose que son diversos y que actúan a varios niveles.

FACTORES QUE AFECTAN LOS NIVELES DE BIOSÍNTESIS DE UNA PROTEÍNA

Estos factores se pueden dividir en dos clases: aquellos que afectan la cantidad de mRNA disponible y aquellos que involucran la traducción de dicho mRNA y a la proteína misma. En la figura 1 se resumen todos estos factores y se explican a continuación.

1) FACTORES TRANSCRIPCIONALES.

Podemos resaltar varios factores a nivel del mRNA, como son su velocidad de síntesis, su velocidad de degradación y el número de copias en que esté presente el gene. Estos parámetros están determinados por diversas causas, que se discuten a continuación.

La transcripción del DNA se lleva a cabo mediante una compleja serie de secuencias regulatorias (79, 101). Estas

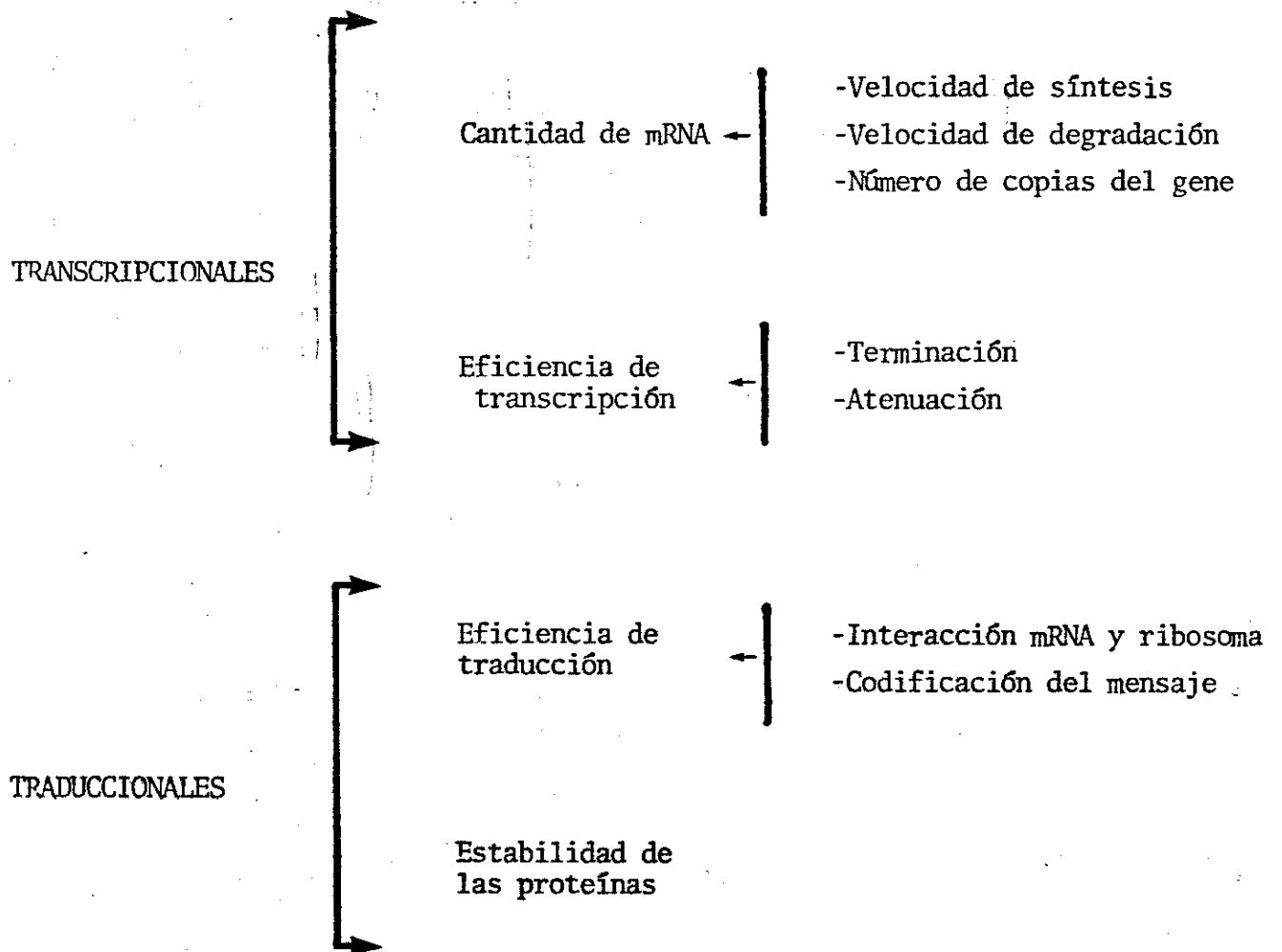


FIGURA 1: FACTORES QUE AFECTAN LOS NIVELES DE BIOSINTESIS DE UNA PROTEINA.

son regiones de DNA no codificadoras que determinan cuándo y a qué nivel se expresa un gene en particular. La información genética contenida en una región regulatoria se manifiesta principalmente a través de interacciones específicas con proteínas regulatorias o con otras proteínas celulares. Las siguientes son algunos ejemplos de regiones regulatorias comunes en procariotes:

- 1.- Promotores
- 2.- Operadores
- 3.- Sitio de unión de activadores
- 4.- Terminadores

Un promotor se define como un segmento de DNA que contiene señales para la unión adecuada y la subsecuente activación de la holoenzima de la RNA polimerasa en una forma capaz de iniciar la síntesis de mRNA. Dentro de, o adyacente al promotor, en algunos casos existe una secuencia adicional de DNA que contiene señales para la unión específica de proteínas represoras (operadores) o activadoras capaces de modular la actividad del promotor. Dicha actividad o fuerza, esta dada por el número de veces que se inicia la transcripción por unidad de tiempo, siendo la máxima fuerza de un promotor aquella en la que la frecuencia de iniciación de la transcripción del mensajero este limitada únicamente por la velocidad de elongación de la cadena de mRNA (43). La fuerza de un promotor puede

influir en la expresión de un gene de dos a cuatro órdenes de magnitud (66, 99).

El análisis de la secuencia consenso de 112 promotores procariotes (44) deja ver que existen ciertas regularidades, básicamente la conservación de las bases en las regiones de -10 y -35, la distancia entre estas regiones y la asimetría de las secuencias promotoras (para iniciar la síntesis de mRNA en la dirección correcta) (81). Sin embargo, hay cuando menos dos consideraciones importantes:

1.- Ciertos cambios en las bases en las regiones -35 y -10 pueden no afectar la naturaleza o posición de los grupos funcionales en las bases que son esenciales para la interacción de éstas con los aminoácidos de la polimerasa (101).

2.- La variación de la secuencia de los promotores en las regiones de contacto con la RNA polimerasa puede jugar un papel importante en la regulación de la expresión de genes, ya sea aumentando o disminuyendo la fuerza del promotor (101).

Existen además evidencias de que la secuencia de bases hacia arriba del -35 es importante también para la función del promotor. El caso mejor documentado es el de el gene del tRNA de tirosina de E. coli. Al gene silvestre se la

hicieron deleciones al azar a partir de la posición -300 aproximadamente en dirección al promotor, observándose que mientras mayores eran dichas deleciones menor era la expresión del gene (57).

La regulación de la velocidad con la que un promotor inicia la síntesis de mRNA se lleva a cabo con tres tipos de interacciones moleculares (101):

1) La interacción de la RNA polimerasa con la secuencia nucleotídica del promotor, lo que determina la fuerza intrínseca del promotor.

2) La unión en regiones cercanas o competencia directa de activadores o represores y la RNA polimerasa por los sitios de unión al DNA. Ejemplos de este mecanismo son: la unión de los represores de lac y de lambda en sus sitios operadores y la unión de la proteína activadora del catabolito activada por cAMP en el sitio específico de unión, vecino al promotor.

3) La unión de proteínas o bien de moléculas efectoras pequeñas directamente a la RNA polimerasa, lo cual modifica la afinidad o la especificidad del complejo de la polimerasa resultante por el promotor. Ejemplos de este tipo de interacción son la subunidad sigma, la proteína del gene nusA, y los factores "estrictos" (ppGpp) de iniciación.

Estos se unen al cuerpo de la polimerasa y modulan su especificidad inicial de unión o la velocidad de elongación.

Los terminadores de la transcripción son regiones de DNA que provocan la separación de la RNA polimerasa del DNA. Los hay de dos tipos: dependientes del factor rho e independientes de rho. Los terminadores dependientes de rho son regiones de DNA simétricas donde la RNA polimerasa hace una pausa, y si rho está presente, hay desprendimiento del mRNA. En ausencia de rho no hay terminación (79).

Los terminadores de la transcripción rho independientes son regiones transcritas en el mensajero que tienen tres características: una secuencia invertida repetida capaz de formar una estructura de tallo y asa (mediante la formación de puentes de hidrógeno consigo misma), un número variable de residuos uracilo después de la secuencia invertida repetida; y una secuencia rica en G:C de longitud variable (3 a 11) precediendo el sitio de terminación (46, 79). Estas regiones se encuentran generalmente al final de genes y operones.

Los atenuadores son regiones de DNA que se encuentran generalmente en los operones biosintéticos para ciertos aminoácidos. Su función es la de terminar prematuramente parte de los transcritos que se generan en el promotor. El mecanismo mediante el cual ejercen su región regulatoria es

el de provocar una disminución en la velocidad de traducción y dado que la transcripción y la traducción son procesos acoplados, la pausa de los ribosomas causa el desprendimiento del complejo transcripcional (105, 107).

Sin embargo, secuencias con características similares a los terminadores y atenuadores dentro de genes estructurales, pueden causar el desprendimiento prematuro de la RNA polimerasa. La presencia de dichas secuencias es indeseable para la elevada expresión de un gene.

Los factores que determinan la estabilidad del mRNA no están bien entendidos, ni tampoco se sabe con certeza qué tan importante es este aspecto en la expresión de un gene. Algunos autores (3, 100) han demostrado que la cinética y tipo de degradación de los mensajeros es variada, y parece ser intrínseca de cada mRNA. El casi nulo conocimiento sobre esto hace difícil el planteamiento de una estrategia que permita sobrepasar este problema. Sin embargo, en cepas de E. coli deficientes en la enzima polinucleótido fosforilasa y RNasa I, se encontró que la vida media del mRNA específico de genes heterólogos aumenta tres veces cuando menos. Este fenómeno sugiere que existen factores estructurales conservados en los mRNA bacterianos que están ausentes en los mensajeros heterólogos y que los hacen resistentes a la acción de nucleasas. El uso de cepas deficientes en la actividad de estas nucleasas puede ser útil para disminuir

el problema de la inestabilidad de mensajeros de genes clonados (42, 72).

El número de copias en que esté presente un gene transcripcionalmente activo puede tener un efecto significativo en la eficiencia de su expresión (6, 98). Además puede ser importante en sistemas donde se tenga una producción fija de reguladores negativos (represores), como es el caso del operón de lac en el que las cepas silvestres de E. coli contiene 20 copias de represor por célula. De este modo, al elevar la dosis génica de operadores, los represores son titulados y la síntesis de mensajero a partir del promotor se vuelve constitutiva (77).

2) FACTORES TRADUCCIONALES.

La iniciación de la traducción en E. coli es un proceso multicomponente que involucra la interacción de tres especies de RNA (16s rRNA, mRNA y fmet-tRNA), tres factores de iniciación IF1, 2 y 3, y la proteína ribosomal S1 (35). La interacción ribosoma-mRNA, la codificación del mensaje y la estructura de la proteína son factores traduccionales que afectan los niveles de biosíntesis de proteínas. Como ya se mencionó anteriormente, la fuerza de un promotor puede influir en la expresión de un gene al menos cuatro órdenes

de magnitud (99). Por lo que respecta a la eficiencia de traducción se considera que puede variar cuando menos diez veces (15).

El primer factor que afecta la traducción de un mensaje es la interacción del mRNA con el ribosoma. A este respecto hay dos puntos de interés principales. Uno es el sitio de unión a ribosoma que este codificado en el extremo 5' del mensajero y el otro es la secuencia de bases que sigue a este sitio de unión. Analizando varios sitios de unión a ribosomas, Stormo y colaboradores (90) han establecido que la secuencia que aparece con mayor frecuencia en el sitio de unión a ribosomas (o secuencia de Shine-Dalgarno) de diversos genes de E. coli es AGGAG. Se sabe además que la distancia entre este sitio y el codón AUG de iniciación de la traducción es importante (75, 76, 86, 87) así como la secuencia que existe entre ambos (63).

La estructura secundaria de la región de iniciación de la traducción en el mRNA puede ser importante para la eficiencia del proceso, siendo la accesibilidad del AUG para el ribosoma uno de los factores principales que determinan la fuerza de una señal de traducción (13, 39, 49). Existen ejemplos bien documentados de que esto sucede IN VITRO con algunos genes de origen viral (30, 51). Existen casos específicos en los que se ha demostrado que otras secuencias pueden afectar la eficiencia de traducción de ciertos genes.

Por ejemplo, en el caso de la proteína de la cápsula del fago Q-beta se demostró que el cambio de AUGG a AUGA eleva la frecuencia de la iniciación de la traducción del complejo IN VITRO, lo que sugiere que pudiera darse el caso con otros genes (28).

El segundo factor importante es la codificación intrínseca del mensaje genético. Esta es particular de cada gene y de cada especie y la eficiencia de traducción a este nivel esta dada por la disponibilidad de tRNAs del huésped (48). Este factor no puede ser manejado a menos de que el gene a expresar sea sintetizado en el laboratorio. Si este es el caso, la elección de tripletes codificadores debiera hacerse de acuerdo a las especies mas usadas y abundantes en el huésped (38, 48).

Las proteínas sintetizadas en un huésped heterólogo no siempre son estables. El sistema de degradación de proteínas de E. coli puede interferir con los intentos de reproducir una proteína en la bacteria. Este problema se hizo evidente en los primeros experimentos de expresión de genes heterólogos que se realizaron (50). Una forma de evitar este problema ha sido mediante la precipitación del producto protéico en el citoplasma bacteriano. Aunque algunos polipéptidos como el interferón son capaces por sí mismos de precipitar en el interior de la célula (Heyneker H.R., datos sin publicar), otros péptidos necesariamente

tienen que fusionarse a otra proteína que permita su precipitación, como es el caso de la beta-galactosidasa sin los últimos 18 aminoácidos (31, 50). Al generarse una proteína híbrida surge el problema no siempre sencillo de separar el péptido de interés de su precursor protéico. No existe un esquema generalizado para la solución de este problema, por lo que debe hacerse una estrategia específica para cada proteína. Con el uso de cepas Deg (deficientes en su sistema de degradación de proteínas) se ha sobrepasado en parte este problema (36, 93).

El conocimiento básico acerca de la influencia que todos estos factores ejercen sobre los niveles de sobreproducción de una proteína nos permiten plantear estrategias para el diseño de secuencias de DNA que dirijan la síntesis eficiente de proteínas.

DISEÑO DE UN SISTEMA DE EXPRESION DE DNA

La gran variedad de parámetros conocidos que intervienen en la eficiencia de biosíntesis de proteínas en E. coli hacen que el diseño de un sistema de expresión de un gene sea altamente complejo. Pueden variarse ciertos factores transcripcionales y traduccionales, pero no existe a la fecha conocimiento suficiente para variar todos

los parametros y obtener así el sistema óptimo para la producción de la proteína deseada. Tampoco se sabe el efecto que la optimización de algun factor aislado puede tener sobre los demás factores o cual sera la reacción fisiológica del huésped frente a la información genética modificada. Cualquier intento de manipulación de señales transcripcionales y traduccionales con el fin de mejorar los niveles de producción de una proteína debe hacerse teniendo presentes estas restricciones. Por esto, no se puede predecir cuál será el comportamiento de un sistema nuevo, y es necesaria la experimentación de diversas condiciones y cepas para construir un sistema de biosíntesis con un nivel adecuado a los objetivos que se persigan.

La elección de la cepa de E. coli es un paso crítico y debe hacerse generalmente de acuerdo al sistema genético que se utilice para la expresión. Ciertos genotipos pueden facilitar el manejo del sistema, ser indispensables para el funcionamiento del mismo o bien llegar a afectar drásticamente la producción de ciertas proteínas. Se sabe poco acerca del efecto que la información genética heteróloga pueda ejercer sobre distintas cepas. Remaut et al. (73) han demostrado que llega a haber una variación en la biosíntesis de interferón de fibroblasto hasta de 10 veces según la cepa. Esto hace de la elección de la cepa un paso delicado.

Sin embargo, existe otro punto importante a considerar

que es el nivel de producción al que se desee escalar el proceso. Para trabajar una cepa a nivel laboratorio es conveniente que ésta presente características como facilidad de cultivo, manejo sencillo, transformabilidad con plásmidos y que el DNA introducido sea estable. En cambio, para escalar el proceso a nivel de planta piloto otras características pueden ser deseables también, como son que la cepa tenga una elevada velocidad de crecimiento, requerimientos de nutrientes de bajo costo, disponibilidad de los mismos, estabilidad del genotipo (que no reviertan características deseables), etc.

El diseño y construcción de un sistema de biosíntesis es el primer paso para la obtención de proteínas por ingeniería genética. Una vez logrado esto, es necesaria la optimización del proceso, lo que hace indispensable la interacción de diversos grupos de trabajo para lograr el objetivo final de una manera eficiente.

Los resultados presentados en esta tesis son trabajos iniciales a nivel laboratorio, no son de manera alguna los mejores. Estos resultados servirán como punto de partida a investigaciones cuyo objetivo será el mejoramiento del sistema genético, el montaje y optimización de métodos de crecimiento bacteriano, y la purificación y manejo de proteínas.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo consiste en diseñar, utilizar y comparar diferentes sistemas de expresión genética que permitan la producción, en la bacteria Escherichia coli, de proteínas y péptidos específicos.

Concretamente, se diseñaron y se construyeron sistemas de expresión para los genes sintéticos que codifican para las cadenas A y B de insulina humana y para el cDNA que codifica para el interferón leucocitario humano tipo A o alfa-2. Para la expresión de las cadenas de insulina, se seleccionaron dos conjuntos de elementos regulatorios que permiten la transcripción controlada de genes estructurales. Estos elementos son el promotor y operador del operón de lactosa (lac) y el promotor y operador del operón de triptofano. Asimismo, se seleccionaron dos distintos genes estructurales para fusionarlos a las cadenas y así lograr su estabilización en E. coli. Para el caso del interferón, se eligió el promotor y operador de triptofano. En este sistema, esta proteína se sintetiza directamente, sin la participación de una proteína precursora.

CAPITULO 2

EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS CADENAS A Y B DE INSULINA HUMANA.

El criterio principal para la elección de la insulina como modelo es su gran importancia biológica como modulador en ciertos pasos del metabolismo. Esta hormona es producida en el páncreas por los Islotes de Langerhans. Está formada por dos cadenas (A y B) unidas entre sí por puentes disulfuro. En mamíferos, la insulina es sintetizada como un precursor peptídico de una sola cadena llamado preproinsulina, la cual es procesada intracelularmente por enzimas específicas, perdiendo un segmento inicial al ser transportada fuera de la célula y formando la proinsulina. Esta proinsulina es posteriormente reprocesada extracelularmente por otras enzimas, perdiendo un fragmento interno (peptido C), dando como resultado una molécula de insulina (41). En la figura 2 se muestra la estructura de la proinsulina humana.

La insulina desempeña un papel importante dentro del metabolismo general, causando un aumento en el metabolismo de los carbohidratos, síntesis de ácidos grasos, captación de aminoácidos y síntesis de proteínas. Por esto es una

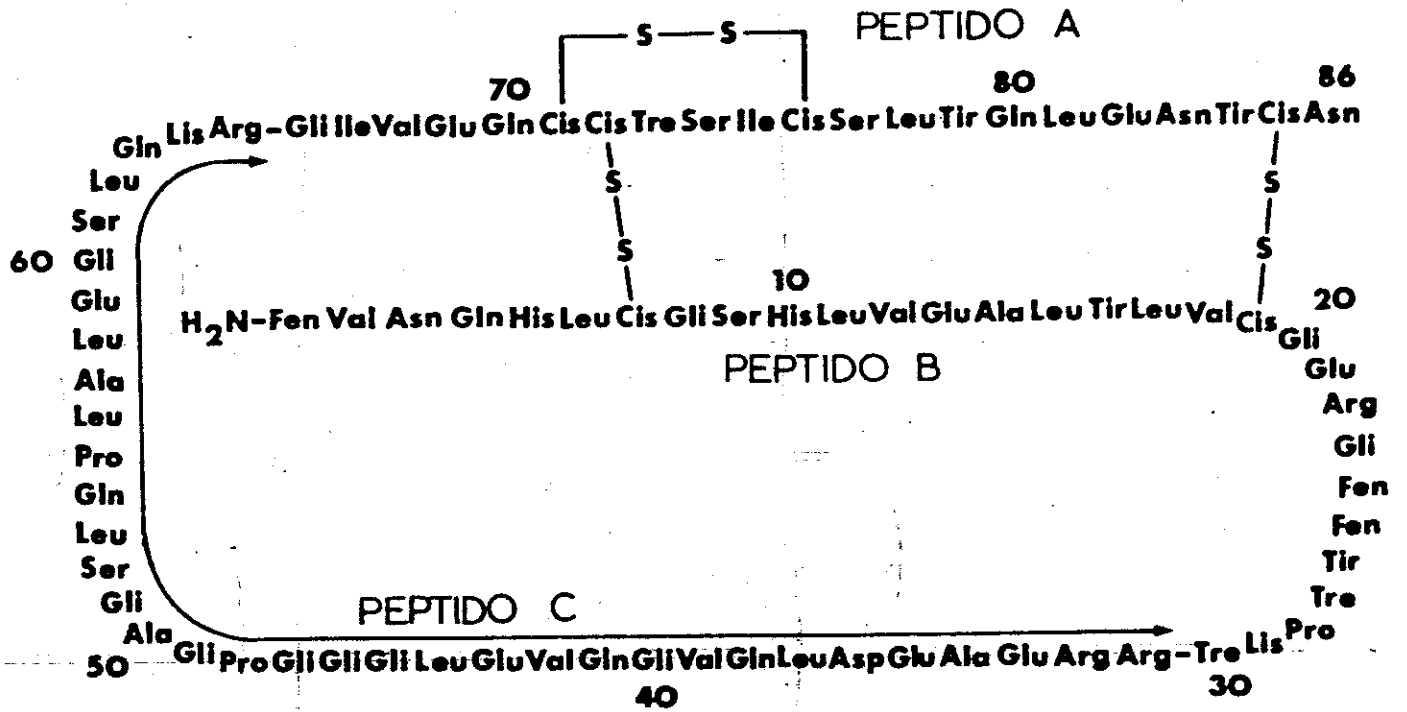


FIGURA 2: SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA PROINSULINA HUMANA.

importante enzima anabólica que actúa sobre una gran cantidad de tejidos, principalmente el hígado, músculos y tejido adiposo. Es un fuerte hipoglucemiante ya que favorece los mecanismos de transporte de glucosa hacia el interior de las células (41).

La deficiencia de esta hormona produce una enfermedad llamada Diabetes mellitus, la cual se controla mediante dietas adecuadas y en algunos casos mediante la aplicación de insulina.

Las fuentes convencionales de obtención de insulina comercial para fines terapéuticos son los páncreas de algunos mamíferos (ovinos, bovinos, equinos y porcinos), y aunque las moléculas de insulina no son exactamente iguales, la actividad biológica se mantiene prácticamente constante para todas las insulinas (41). Sin embargo, pequeñas diferencias en la composición de aminoácidos de estas insulinas con respecto a la humana, son suficientes para producir reacciones antigénicas en algunos pacientes. Esta es una de las razones por las que se ha desarrollado un sistema para la obtención de la hormona humana mediante la recombinación IN VITRO de ácidos nucleicos (31). Para lograr ésto se han utilizado dos estrategias: la biosíntesis de las cadenas A y B por separado, o la biosíntesis de la proinsulina. En el caso de la síntesis de las cadenas existe el problema de la reasociación de éstas mediante la formación correcta de los puentes disulfuro. Después de la

reasociación, existe la necesidad de una purificación final para eliminar cualquier contaminación de otros isómeros, ya que estas moléculas pudieran ser inmunogénicas (52). La biosíntesis de la proinsulina puede disminuir este problema, ya que el péptido que conecta las cadenas A y B (péptido C) favorece el doblamiento de la molécula hacia la formación de los enlaces disulfuro correctos. Sin embargo, la eliminación del péptido C no es un proceso sencillo, ya que se requieren condiciones especiales para la ruptura con una mezcla de la proteasas tripsina y catepsina B. Ambas estrategias se están utilizando en el laboratorio, y en este trabajo se presenta la construcción de cepas productoras de las cadenas A y B de insulina en forma de proteínas híbridas.

Dado que las secuencias de aminoácidos de las cadenas A y B de insulina se conocen, se diseñaron a partir del código genético, dos fragmentos de DNA sintético conteniendo la información que codifique para los 21 aminoácidos de la cadena A y los 30 de la cadena B. La elección de los tripletes a utilizar se llevó a cabo con base en las siguientes consideraciones:

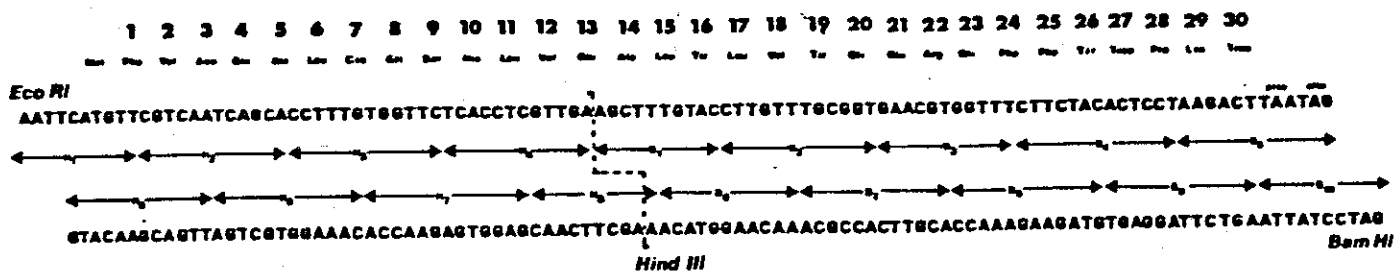
- 1) No todos los tripletes son utilizados igualmente en todos los organismos, dado que la disponibilidad de tRNAs varia de especie a especie. Por tanto, se eligieron aquellos codones utilizados preferentemente en E. coli (48).

2) En vista de que la secuencia se construiría a partir de una serie de fragmentos traslapados en sus extremos (figura 3), los fragmentos se diseñaron para evitar apareamientos inespecíficos (22).

3) Se evitaron secuencias ricas en timina y adenina, seguidas por secuencias ricas en citosina y guanina, ya que este tipo de secuencias están involucradas en la terminación de la transcripción (79).

Para el caso de la cadena A, se sintetizaron 12 oligonucleótidos de varios tamaños, que al unirse por puentes de hidrógeno por complementariedad, forman la doble hélice de DNA que codifica para la cadena. Para establecer la unión fosfodiéster entre estos fragmentos, se añadió ligasa de DNA del fago T4. Otras características de los genes sintéticos son: la presencia en uno de los extremos de los nucleótidos 5'AATT (hélice sencilla) y en el otro CTAG 5'. Estos son los extremos cohesivos que se obtienen de la digestión de fragmentos de DNA con las enzimas EcoRI y BamHI respectivamente, que permiten unir el gene a un vehículo molecular previamente digerido con estas enzimas. En la parte del gene correspondiente al extremo carboxilo terminal de la proteína aparecen también dos codones de terminación para detener la traducción en este punto. Por último se incluyó un codón ATG que codifica para metionina al principio del gene estructural. La presencia de esta

Gene cadena B



Gene cadena A

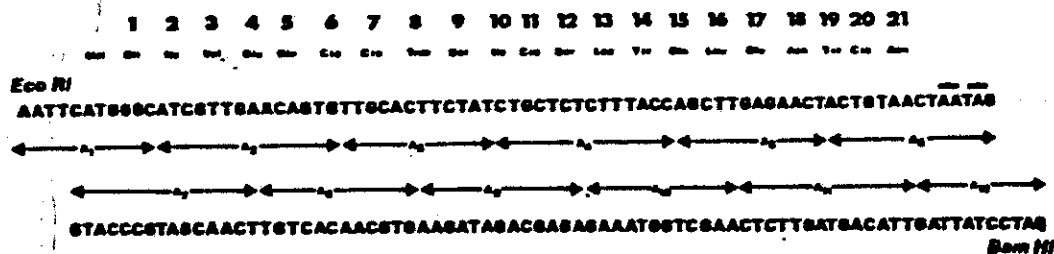


FIGURA 3: DISEÑO Y CONSTRUCCION DE LOS GENES SINTETICOS QUE CODIFICAN PARA LAS CADENAS A Y B DE INSULINA HUMANA.

metionina como primer aminoácido permite liberar a la cadena A o B de su precursor inactivo (se explicará posteriormente). Para el caso de la cadena B se sintetizaron 18 fragmentos y se siguió un procedimiento similar al de la cadena A (22). Los genes así contruidos fueron clonados en el vehículo molecular pBR322 (12) por el Dr. F. Bolívar.

Como se mencionó anteriormente, los experimentos iniciales de expresión de genes sintéticos que codifican para péptidos de bajo peso molecular, mostrarón que proteínas pequeñas no eran producidas en E. coli, probablemente porque eran reconocidas como extrañas y degradadas en el citoplasma bacteriano (50). Una manera de estabilizar estas pequeñas proteínas es mediante la fusión de genes (5). Se pueden "disfrazar" las cadenas A y B fusionándolas a un fragmento de una proteína propia de la bacteria, de tal modo que el péptido de interés no sea degradado. Cabe hacer notar que la fusión de genes trae como consecuencia la creación de híbridos, que son proteínas nuevas de características fisicoquímicas y biológicas desconocidas, por lo que no se sabe el efecto que éstas puedan causar al huésped. Con esta limitación en mente, Goeddel y colaboradores (31), procedieron a diseñar un sistema que permitiera la biosíntesis de las cadenas A y B en forma de una proteína híbrida. Es en este punto donde se hace patente la importancia del triplete ATG al principio de los genes estructurales, ya que la metionina para la que codifica dicho codón puede ser tratada químicamente con

bromuro de cianógeno para liberar a las cadenas de su precursor peptídico. Esto es posible dado que ninguna de las cadenas de insulina contienen metioninas en su secuencia.

A continuación se presentan los dos sistemas alternativos para la producción de las cadenas A y B de insulina humana en E. coli.

1) EXPRESION DE LOS GENES SINTETICOS A PARTIR DEL PROMOTOR lacUV5 EN FORMA DE PROTEINAS HIBRIDAS CON beta-galactosidasa.

El promotor lacUV5 ha sido utilizado frecuentemente para la expresión de genes porque es uno de los primeros promotores estudiados. En cepas silvestres de E. coli, el promotor lac dirige la expresión del operón para el catabolismo de la lactosa, que está constituido por tres genes estructurales, el primero de los cuales codifica para la beta-galactosidasa. El promotor silvestre de lac tiene dos modos de regulación: es controlado negativamente por el represor de lac, y necesita del AMP cíclico y su proteína receptora para llegar a su máxima actividad. El promotor mutante lacUV5 no necesita de esta última. El control negativo es ejercido por el represor de lac que se une al operador del operón. Este operador está contenido en una secuencia de 22 pares de bases que se localiza a 6 pares de bases hacia abajo de la caja de Pribnow. El inicio transcripcional del promotor lacUV5 es en el comienzo del operador de lac (figura 4). De esta forma, el represor de lac evita la unión de la RNA polimerasa mediante un impedimento físico. El sistema puede ser inducido, ya sea con un inductor natural derivado de la lactosa (alolactosa), o bien mediante la adición de un análogo sintético de la lactosa llamado isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG), el cual es metabólicamente estable.

región -35 del promotor del gene lac i (que codifica para el represor), y esta alteración lleva a la sobreproducción de moléculas de represor. E. coli D1210 lac i^q es un ejemplo de este tipo de huéspedes. En esta cepa, el promotor de lac se encuentra reprimido aunque se encuentre en alto número de copias, y puede ser inducido solamente con la adición de un inductor en el medio. La posibilidad de ejercer este control estricto sobre la transcripción del promotor de lac es la característica primordial por la que se eligió trabajar con esta región de regulación.

En la figura 5 se esquematiza la construcción de los plásmidos que codifican para las proteínas híbridas beta-galactosidasa - cadena A (pBR213) y beta-galactosidasa - cadena B (pBR275). Se comenzó a trabajar con dos de estos plásmidos: el pBR213 y el pBR271, los cuales fueron proporcionados por el Dr. F. Bolívar. Como puede observarse, el pBR213 tiene insertado el fragmento del operón de lactosa necesario para la expresión de la cadena A; y el pBR271 carece del mismo. A este último hubo que insertarle dicho fragmento para lograr la biosíntesis de la proteína híbrida con cadena B. Así se dio origen al pBR275.

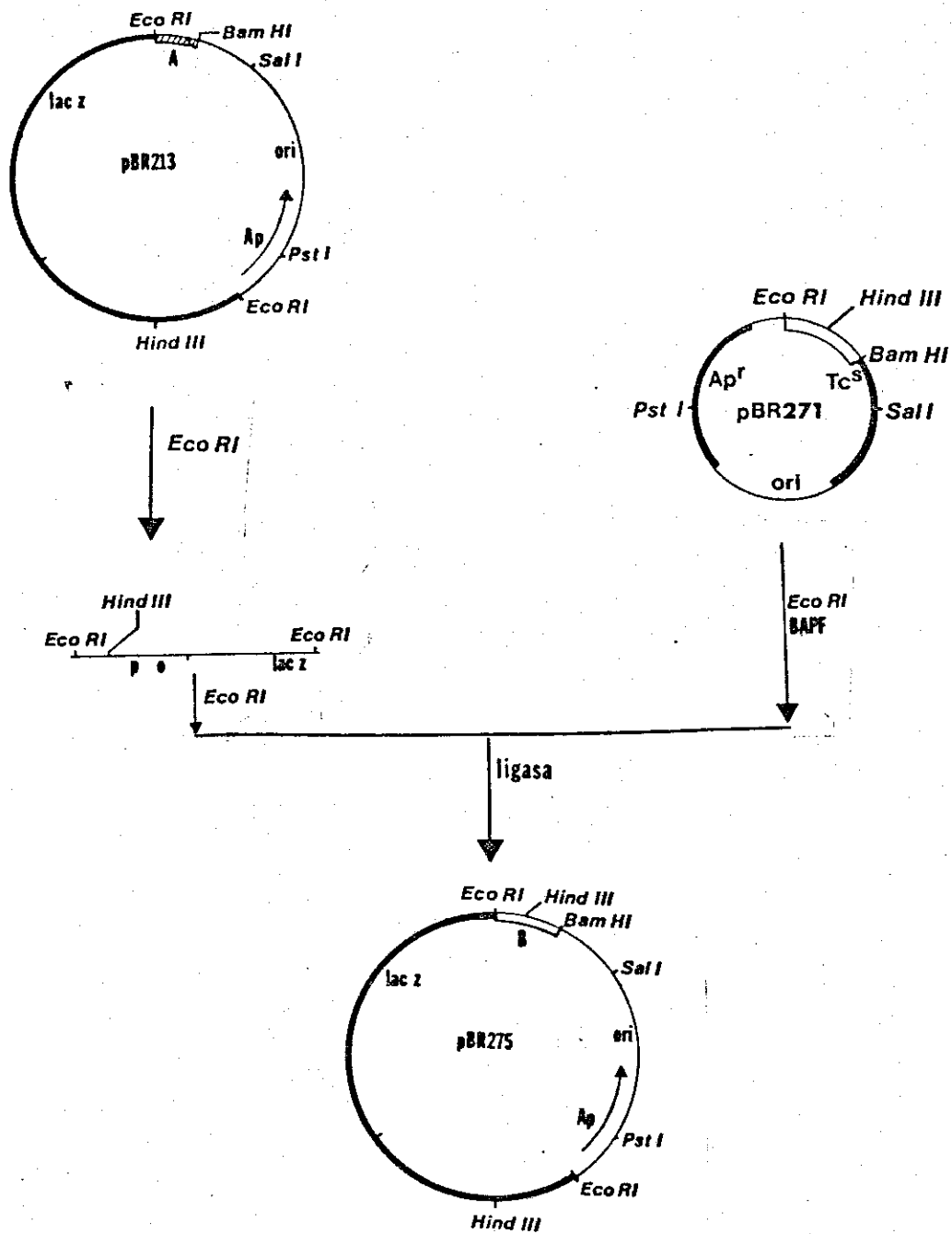


FIGURA 5: CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS PARA LA EXPRESION DE LOS GENES SINTETICOS.

RESULTADOS

1) Elección de la cepa receptora.

La elección de la cepa receptora se llevó a cabo con base en dos criterios principales:

a) La cuantificación de la proteína híbrida biosintetizada por este sistema de expresión se llevaría a cabo mediante un método densitométrico dada la pérdida de la actividad enzimática de la beta-galactosidasa troncada. Por esto es deseable que el genotipo del huésped sea $lacZ^-$.

b) Como se desconoce el efecto que la producción de las proteínas híbridas pudieran causarle a la cepa receptora debe considerarse el manejo de cepas $lac i^-$ y $lac i^q$.

Para los experimentos iniciales se eligieron dos cepas alternativas: la cepa de E. coli K-12 MX614, que fue construida en el laboratorio del Dr. F. Bastarrachea a partir de la cepa CSH41. Esta cepa tiene deletado el gene $lacZ$ y además no produce moléculas de represor ($lacZ^-$, $lac i^-$). Se consideró además el uso de la cepa de E. coli K-12 D1210 (31) la cual sobreproduce represor de lac pero si

sintetiza beta-galactosidasa silvestre ($lacZ^+$, $lac i^q$). La primera cepa es importante en cuanto a que la cuantificación densitométrica es mas sencilla porque toda la proteína que comigre en un gel desnaturalizante de proteínas con un control de beta-galactosidasa silvestre será proteína híbrida. Sin embargo, utilizando la segunda cepa se puede controlar la expresión del sistema con IPTG.

Cepas $lac i^-$ serán adecuadas si las proteínas sintetizadas DE NOVO son inocuas; pero si estas ejercen un efecto nocivo al receptor, es indispensable tener el control genético de la expresión del sistema, por lo que una $lac i^q$ será adecuada.

Todas las cepas transformadas se crecieron en medio selectivo con 100 μ g/ml de ampicilina, la cual se agregó únicamente al inicio de cada fermentación

2) Clonación del fragmento de DNA que contiene parte del operón de lactosa en el pBR271.

A partir del plásmido pBR213 (figura 5) se aisló el fragmento de DNA de 4.4 Md que contiene la región regulatoria $lacUV5$ y la región que codifica para los primeros 1003 aminoácidos de la beta-galactosidasa, mediante una digestión con EcoRI. Este fragmento fue clonado en el sitio de EcoRI del pBR271.

La mezcla de ligado se transformó en la cepa de E. coli K-12 RR1 con el fin de detectar aquellas colonias donde se hubiera insertado el DNA del operón de lac. Esto es posible al crecer la cepa transformada en cajas con X-gal, que es un galactósido que al ser hidrolizado por la beta-galactosidasa se torna azul. Aunque la proteína sintetizada por los plásmidos no presenta actividad, el exceso de operadores de lac titula los represores de la célula y se expresa el gene silvestre, obteniéndose así la hidrólisis del galactósido.

Las colonias transformantes se analizaron para determinar la orientación de la inserción del fragmento. Aquel que presentó el patrón esperado se denominó pBR275. Tanto el pBR275 como el pBR213 fueron introducidos en la cepa MX614 para analizar la biosíntesis de los híbridos.

3) Biosíntesis de la proteína híbrida beta-galactosidasa-cadena A de insulina

El pBR213 fue introducido en la cepa MX614 para analizar la biosíntesis de la proteína híbrida con cadena A. Con el fin de observar el comportamiento de la cepa transformada y de la silvestre, se determinaron las curvas de biosíntesis de proteínas según la absorbancia o densidad óptica (DO) del cultivo. Dado que la velocidad de crecimiento de la cepa es máxima en medio M-9 con glucosa como fuente de carbono (4)

se eligió este medio para hacer estas determinaciones.

El procedimiento consistió en crecer alicuotas de 25 ml cada una de las dos cepas a distintas DO y romperlas por sonicación. Por el métodos de Lowry se determinó la cantidad de proteínas en alicuotas iguales (3 ml). Los resultados están graficados en la figura 6A. Se observa que la cepa transformada produce mas proteína neta que la cepa silvestre a la misma DO, lo que es consistente con que además de las proteínas nativas de la cepa MX614, se estan produciendo otras proteínas a partir del plásmido.

De las mismas muestras sonicadas se tomaron alicuotas y se centrifugaron por 10 minutos a 10K rpm con el fin de separar la proteína híbrida de las proteínas solubles. Posteriormente se determinaron las curvas de biosíntesis de proteínas solubles y precipitables. Es la figura 6 B y C se muestran estos datos (los valores de las proteínas insolubles se obtuvieron por diferencia).

La cepa silvestre produce proteínas insolubles correspondientes probablemente en su mayoría a proteínas de membranas. Es por esto que al finalizar la fase logarítmica de crecimiento la biosíntesis de estas proteínas disminuye drásticamente. Como se observa en la figura 6 C, en el caso de la cepa transformada, la biosíntesis de la proteína híbrida continúa aunque el cultivo haya alcanzado la fase

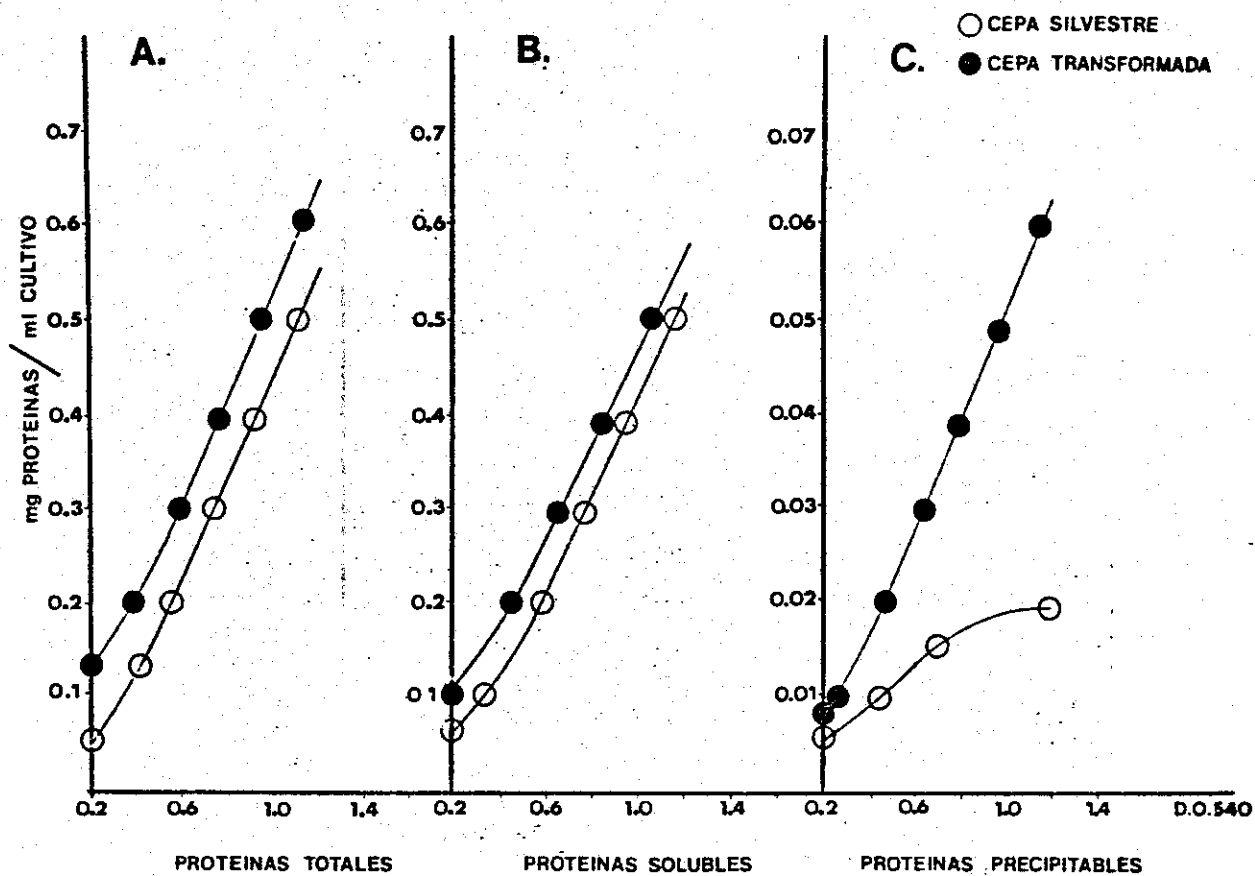


FIGURA 6: CURVAS DE BIOSINTESIS DE PROTEINAS DE LA CEPA MX614 SILVESTRE Y TRANSFORMADA CON EL pBR213 (ver texto para explicación)

estacionaria. Esta proteína es atribuible al híbrido ya que éste se precipita en medio acuoso.

En el caso de las proteínas solubles era de esperarse que la curva de la cepa transformada fuera igual a la curva de la cepa silvestre ya que toda la proteína híbrida insoluble debería haber sido precipitada por centrifugación. Sin embargo, como se observa en la figura 6 B una parte de la proteína insoluble, probablemente quedó en el sobrenadante. Esto puede indicar que las condiciones de tiempo y velocidad de centrifugación no fueron adecuadas o bien que una parte de la proteína híbrida se conserva soluble.

Para apoyar esta hipótesis se analizaron por electroforesis las proteínas obtenidas en cada fracción a una absorbancia (550) de 0.8, y los resultados se muestran a continuación.

4) Cuantificación de la proteína híbrida con cadena A.

En la figura 7 se muestra una electroforesis de un extracto celular de la cepa MX614 con el pBR213. El carril A corresponde a la beta-galactosidasa comercial purificada (5 µg); el B a las proteínas totales (40 µg); el C a proteínas solubles (40 µg) y el carril D a proteínas precipitables (40 µg).

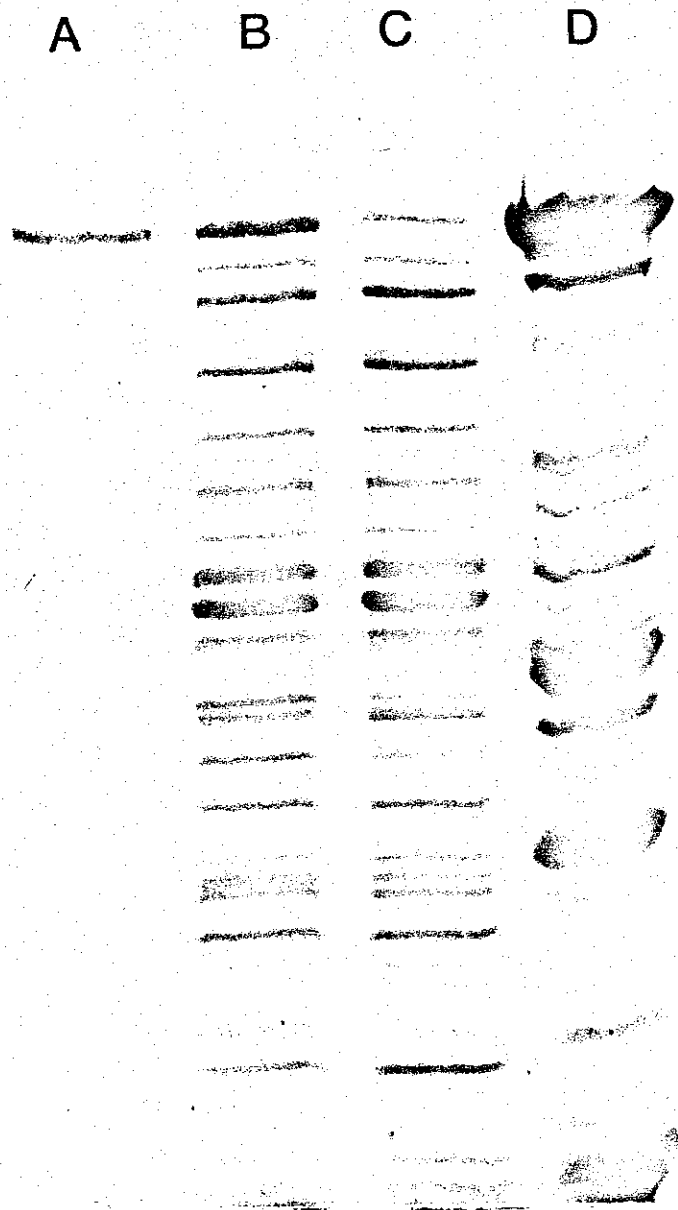


FIGURA 7: ELECTROFORESIS DE UN EXTRACTO CELULAR DE LA CEPA MX614 CON EL pBR213 (cadena A).

- (A) beta- galactosidasa comercial
- (B) proteínas totales
- (C) proteínas solubles
- (D) proteínas precipitables

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.

UNIDAD ACADEMICA DE
 LOS CICLOS PROFESIONAL
 Y DE POSGRADO / CCH

(40 µg). Se demuestra que la proteína extra obtenida tiene un peso molecular similar al de la beta-galactosidasa silvestre, y también puede observarse que en el sobrenadante quedan residuos de beta-galactosidasa híbrida, por lo que el métodos de separación debe ser mejorado (esto apoya los datos presentados en la figura 6).

Dado que este híbrido no presenta actividad, tuvo que buscarse un medio indirecto de lograr la cuantificación de la proteína. Se eligió un método densitométrico que consiste en someter a un extracto de células a electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. Las proteínas se separaron de acuerdo a su tamaño y, una vez tenidas con azul de Coomassie, se cortaron los carriles del gel correspondientes a cada una de las muestras.

Estos trozos de gel se analizaron en un densitómetro Gilford, el cual permite obtener una gráfica en papel de la intensidad y posición de las bandas correspondientes a las proteínas separadas en el gel. Al integrar el area bajo la curva se obtuvo la proporción (%) correspondiente a la proteína híbrida con respecto a las demas. Este valor, junto con el que se obtuvo de cantidad de proteínas totales nos dan una idea aproximada de la concentración de proteína híbrida. Utilizando este método densitométrico se determinó la cantidad de proteína híbrida producida en M-9 cuando la DO del cultivo era de 0.8. La tabla 1 muestra los resultados cuantitativos de este experimento. Para estas condiciones de

FRACCION PROTEICA	PICO DE BETA-GAL	OTROS
PROTEINAS TOTALES	9.0 %	91.0 %
PROTEINAS SOBRENADANTE	6.0 %	94.0 %
PROTEINAS PRECIPITABLES	28.0 %	72.0 %

TABLA 1: RESULTADOS DE LA DENSITOMETRIA DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA. LAS MUESTRAS CORRESPONDEN A UN CULTIVO DE MC1061/pBR213 (cadena A de insulina) CRECIDO EN M-9 CON GLUCOSA A UNA ABSORBANCIA (550)=0.8.

cultivo se obtuvo un rendimiento de 120 mg de proteína híbrida por litro, lo cual teóricamente debe equivaler a 2.4 mg de cadena A.

Cabe aclarar que los valores numéricos obtenidos del análisis densitométrico son reproducibles (variabilidad de \pm 2%) pero no son muy exactos. La falta de exactitud se debe a varios factores, principalmente a que el azul de Coomassie no tiñe con igual intensidad todas las proteínas (74) y además no todas las bandas se resuelven con un 100 % de eficiencia. Por tanto, estos resultados no deben considerarse como valores absolutos, sino mas bien como datos utiles para hacer estudios comparativos de biosíntesis de proteínas.

Para obtener valores absolutos de cantidad de proteínas se recomienda implementar una metodología de medición específica para la proteína híbrida.

5) Biosíntesis de la proteína híbrida beta-galactosidasa con cadena B.

El plásmido pBR275 fue igualmente transformado en la cepa MX614. Sin embargo, los análisis iniciales de biosíntesis de proteínas revelaron que la concentración de proteína híbrida con la cadena B era menor a la que se obtenía con el pBR213 en las mismas condiciones y que además la cantidad de beta-galactosidasa-cadena B disminuía conforme aumentaba el

tiempo de fermentación de la cepa transformada. Este fenómeno podría resultar de la selección de mutantes que perdieran la capacidad de sobreproducir el híbrido, si éste reportara una ventaja selectiva a dichas células; o bien a alguna propiedad intrínseca de la proteína híbrida con cadena B. Dado que la región regulatoria y el extremo correspondiente al amino terminal de los dos híbridos era idéntica, la probabilidad de que la baja biosíntesis del híbrido con cadena B se debiera a la transcripción o a la traducción del mensaje era muy baja.

Se decidió analizar nuevamente los patrones de restricción del pBR275 con el fin de comprobar la estabilidad del plásmido en la cepa. Estos experimentos mostraron que en varios plásmidos habían ocurrido deleciones de los fragmentos de DNA correspondientes al operón de lactosa y parte del gene que codifica para la cadena B. En la figura 8 se muestran los patrones de restricción de DNA de plásmido extraído de varias colonias diferentes crecidas toda la noche. Como puede observarse en los carriles A y F la intensidad relativa de algunas bandas es mucho mayor que las que corresponden al operón de lactosa, las cuales en los carriles B y C ya se han perdido totalmente. El carril D es el pBR322 digerido con HaeIII como control de peso molecular. Estos resultados sugieren que existe una ventaja selectiva de aquellas células que han perdido la capacidad de sintetizar el híbrido.



FIGURA 8: PATRONES DE RESTRICCION DE VARIAS COLONIAS DE LA CEPA MX614 TRANSFORMADAS CON EL pBR275. (ver texto para explicación)

Se utilizó entonces la cepa D1210 para transformarla con el pBR275. Se observó que el DNA se mantenía estable en cualquier fase del crecimiento del cultivo. Se determinó que el rango de concentración de IPTG óptimo para la represión del operón de lac es de 2 a 5 mM: a concentraciones menores se detecta la menor producción de proteína híbrida y a concentraciones mayores disminuye la velocidad de crecimiento de la cepa.

La inducción se lleva a cabo de la siguiente manera: se deja crecer un cultivo de la cepa transformada hasta una DO (550)=0.8. Se agrega IPTG a una concentración final de 2 mM y se deja crecer el cultivo por lo menos hasta una DO (550)=1.2. A este cultivo se le determina la concentración de proteínas, se hace una separación de las mismas por peso molecular en un gel de poliacrilamida-SDS y finalmente se determina la proporción de la proteína híbrida mediante un análisis densitométrico del gel. En la figura 9 se muestra un gel donde se analizaron las proteínas totales de varias fermentaciones. Puede observarse que sin IPTG no hay biosíntesis aparente de beta-galactosidasa (carril A) y en los carriles B y C aparece una banda que comigra con el control de beta-galactosidasa purificada (carril D).

A diferencia de la cepa MX614, la nueva cepa sí produce beta-galactosidasa silvestre (carril B), por tanto no toda la proteína que comigra con el control es proteína híbrida. Con el fin de cuantificar la proteína híbrida se hizo un

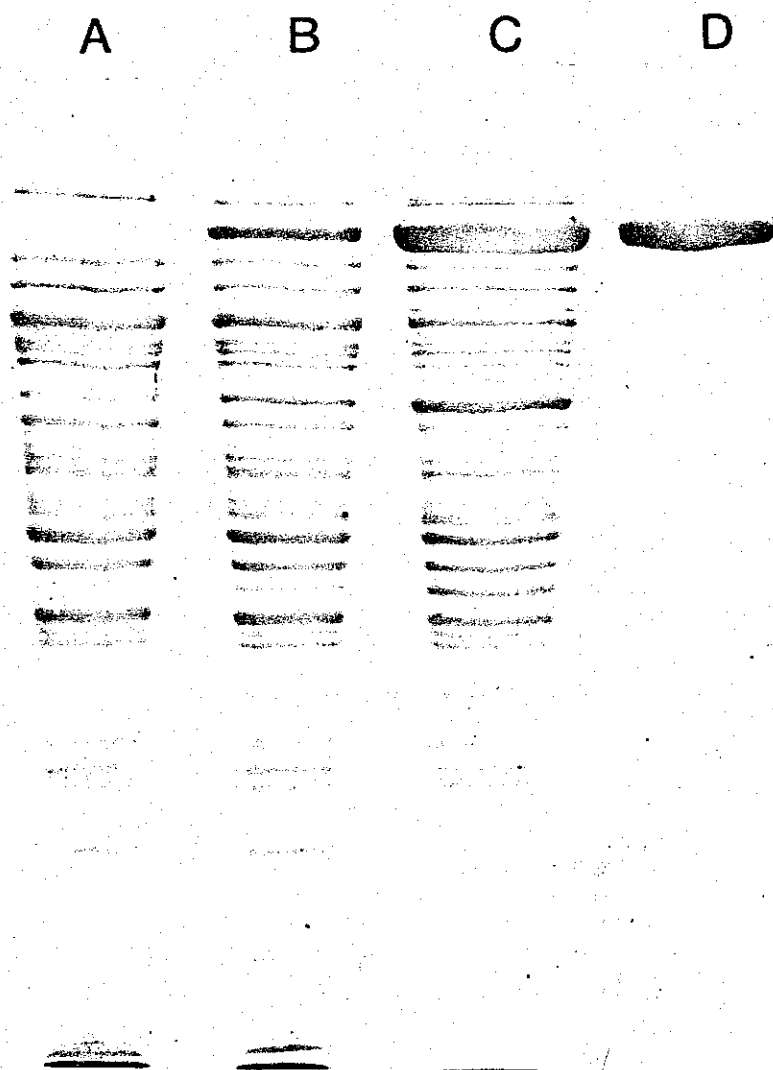


FIGURA 9: ELECTROFORESIS DE UN EXTRACTO CELULAR DE LA CEPA D1210 SILVESTRE Y TRANSFORMADA CON EL pBR275 (cadena B)

- (A) D1210 silvestre
- (B) D1210 + IPTG (condiciones en texto)
- (C) D1210/pBR275 + IPTG
- (D) beta-galactosidasa comercial

análisis densitométrico de los carriles B y C. Las proporciones del pico de beta-galactosidasa híbrida se muestran en la tabla 2. El rendimiento obtenido del híbrido para estas condiciones de crecimiento fue de 75 mg de beta-galactosidasa-cadena B por litro de cultivo (teóricamente se pueden obtener 1.47 mg de cadena B).

Se hizo una cinética de biosíntesis de proteína híbrida con el fin de determinar el tiempo de crecimiento del cultivo una vez que se agrega el IPTG. En la figura 10 se muestran las proteínas obtenidas de cultivos crecidos 1, 2, 3, y 4.5 horas después de la adición del inductor. Se crecieron 25 ml en matraces de 250 ml y se tomaron alícuotas de 3 ml para analizar. De esto se metieron 40 µg por carril en el caso de proteínas totales. De las proteínas insolubles, se centrifugaron 100 µl de lisado y se analizó la fracción precipitable. Como puede observarse, la biosíntesis de la proteína híbrida continúa aun después de que el cultivo haya alcanzado la fase estacionaria de crecimiento y no se aprecia degradación aparente del híbrido. Se recomienda hacer una cinética a tiempos más largos con menor cantidad de proteínas por carril para distinguir con mayor claridad si la producción del híbrido continúa o no.

Los resultados obtenidos del crecimiento de las cepas D1210 y MX614 con el pBR275 sugieren que la beta-galactosidasa-cadena B en la cepa MX614 aporta una

desventaja selectiva para las células si se produce en forma constitutiva, por lo que la capacidad de controlar la expresión del híbrido ha sido hasta el momento la única forma de mantener el pBR275 estable dentro de las cepas de E. coli.

MUESTRA	PICO DE BETA-GAL	OTROS
D1210	2.0 %	98.0 %
D1210/pBR275	9.0 %	91.0 %

TABLA 2: VALORES NUMERICOS OBTENIDOS DE LA DENSITOMETRIA DE LA CEPA D1210 SILVESTRE Y TRANSFORMADA CON EL pBR275 (cadena B de insulina). EL MEDIO ES M-9 CON GLUCOSA A UNA ABSORBANCIA (550)= 1.2 DESPUES DE LA INDUCCION DEL SISTEMA CON IPTG A DO(550)= 0.8.

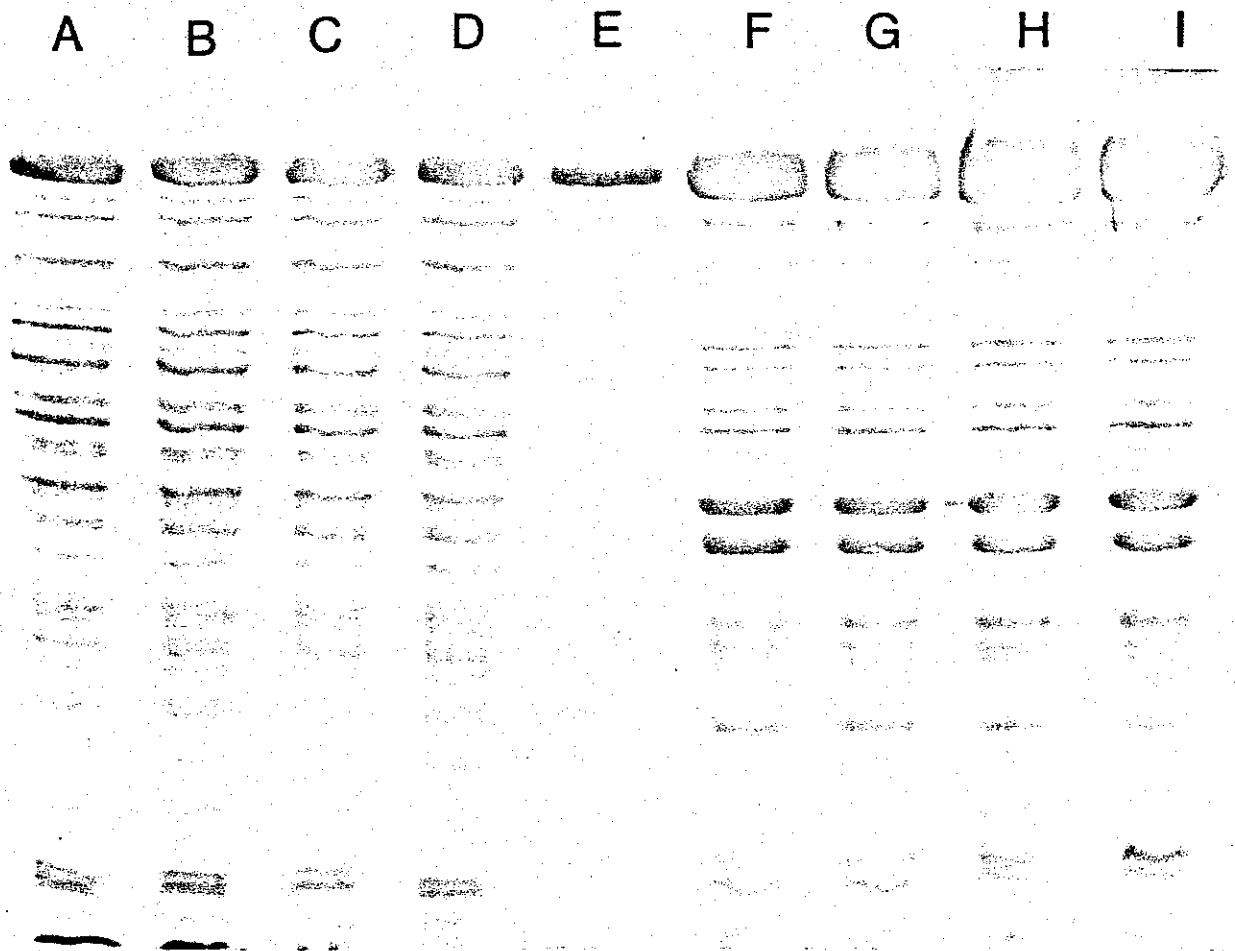


FIGURA 10: ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS CELULARES DE LA D1210 CON pBR275 A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE LA INDUCCION.

FRACCION	FRACCION	TIEMPO
(A) total	(F) insoluble	1 hr
(B) total	(G) insoluble	2 hr
(C) total	(H) insoluble	3 hr
(D) total	(I) insoluble	4.5 hr

(E) beta- galactosidasa comercial

CONCLUSIONES DE LA EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS CADENAS A Y B DE INSULINA A PARTIR DEL PROMOTOR DE LACTOSA.

Una vez verificada la secuencia nucleotidica de los genes sinteticos, se construyeron los vectores de expresion de estos bajo el control de la region regulatoria del operon de lactosa. A partir de ellos se sintetiza en la celula huésped una proteina de peso molecular similar al de la beta-galactosidasa, lo cual sugiere que esta es el hibrido deseado. El plásmido que codifica para el hibrido con cadena A fue introducido en la cepa MX614 y se detectó la biosintesis de ésta (en las condiciones fijadas en este experimento) en una proporcion del 9 % de la proteina total, lo que equivale a 120 mg/l. El plásmido con cadena B tuvo que ser introducido en la cepa D1210 que sobreproduce represor de lac, de modo que se ejerza una represión estricta del sistema de expresion durante las etapas tempranas del crecimiento del cultivo. Este solamente se induce con la adición de algun inductor, en nuestro caso fue con IPTG a concentraciones de 2 a 5 mM.. Los niveles de biosintesis detectados en esta cepa (en las condiciones fijadas en este experimento) fueron de aproximadamente 7 %, lo cual equivale a 75 mg/l. A partir de estos estudios preliminares, otros grupos han mejorado las condiciones de cultivo de estas cepas en terminos de productividad y bajo costo (datos sin publicar de Galindo E. y colaboradores).

Aunque los resultados de análisis de patrones de restricción mostraron que la construcción de los plásmidos fue la esperada, y los geles de poliacrilamida demostraron la biosíntesis de una proteína del peso molecular esperado, no se concluye que la proteína observada contenga en su extremo carboxilo terminal la cadena A o B de insulina. Otros grupos de trabajo han demostrado que la biosíntesis de las cadenas efectivamente se lleva a cabo a partir de estos vectores, ya que han procesado los extractos celulares de las cepas construidas y han logrado la purificación de la cadena A (datos sin publicar de Estrada G. y colaboradores) y de la cadena B (datos sin publicar de Alvarado X. y colaboradores).

Las metodologías de purificación que han sido desarrolladas por estos grupos podran ser utilizadas para la obtención de las cadenas A y B mediante el sistema de expresión que se diseñó posteriormente y cuyas características se exponen a continuación.

2) EXPRESION DE LOS GENES SINTETICOS EN FORMA DE PROTEINAS DE FUSION CON TRANSACETILASA DE CLORANFENICOL A PARTIR DEL PROMOTOR trp.

Las proteínas híbridas generadas con la estrategia anterior presentaron varios problemas que dificultan la purificación de las cadenas A y B de insulina.

En primer lugar, las proteínas son insolubles en medio acuoso, y aunque esta característica representó una ventaja en el paso inicial de purificación de los híbridos, posteriormente hubo que buscar condiciones drásticas para lograr solubilizar los híbridos para su purificación total, tales como cloruro de guanidinio 8 M (31).

En segundo lugar, el tamaño de los híbridos es muy grande y la proporción de las cadenas con respecto al híbrido es muy pequeña, por lo que los rendimientos de purificación se ven muy disminuidos (de cada mg de proteína híbrida se obtiene un máximo teórico de 0.02 mg de cadena).

En tercer lugar, una vez purificada la proteína híbrida es necesario tratarla con bromuro de cianógeno (CNBr) el cual, en condiciones ácidas, corta los residuos de metionina. Debido a que el fragmento de beta-galactosidasa tiene 23 metioninas, se requiere una gran cantidad de CNBr para cortarla (proporción molar de 50 veces por cada metionina). Además se obtienen varios péptidos de los cuales

varios tienen un peso molecular similar al de las cadenas A y B, lo cual dificulta aun mas la purificación (R. Rosales, comunicación personal).

Por otra parte, la producción de proteínas híbridas bajo el control del promotor lacUV5 no es muy eficiente debido a que éste no es muy fuerte (9). Para aumentar la cantidad de mRNA es indispensable usar un promotor mas fuerte.

Se diseñó una estrategia que contendiera con los tres problemas basicos del sistema de lac:

- 1.- La baja fuerza del promotor.
- 2.- Los problemas de purificación de las cadenas A y B a partir de su precursor beta-galactosidasa.
- 3.- Dificultad en el método de cuantificación de los híbridos producidos.

Para esto hubo que utilizar otra región de regulación de la transcripción y otro gene que codifica para la proteína de fusión de las cadenas. Se eligió el promotor del operón de triptofano por estar totalmente caracterizado a nivel de secuencia nucleotídica (106); ser inducible; y ser 3 o 4 veces mas fuerte que lacUV5 (9). Como proteína de fusión se eligió la enzima transacetilasa de cloranfenicol (TACm) o acetil transferasa de cloranfenicol. A continuación se

describe la regulación del promotor del operón de triptofano y se exponen los motivos por los que se eligió el gene de la TACm.

El promotor de *trp* esta regulado por el represor del operón (codificado por el gene *trpR*) y por una región atenuadora de la transcripción. Existe un atenuador entre el inicio de la transcripción (a 173 pares de bases) y el sitio de inicio de la traducción del primer gene estructural del operón, el gene *trpE* (71, 105, 107). Su función regulatoria consiste en terminar prematuramente una considerable fracción de los transcritos que han comenzado en el promotor. La proporción de los transcritos terminados varía de forma inversa con la concentración intracelular de triptofano, pero la atenuación de todos los transcritos no puede lograrse. El sitio de unión del represor, el operador de *trp* (*trpO*), esta sobrelapado con la caja de Pribnow (figura 11), y por tanto evita la unión de la RNA polimerasa. Sin embargo, el producto de *trpR* por sí solo no puede unirse al operador. Necesita un correpresor, que es el producto final sintetizado por las enzimas del operón de *trp*, o sea el aminoácido triptofano. Así, la molécula formada por el aporrepresor de *trp* y el triptofano constituyen el represor que se une al operador de *trp*.

Para lograr la represión del promotor de *trp*, debe añadirse triptofano en el medio de cultivo, y para conseguir la desrepresión de éste se necesita eliminar el triptofano

con el triptofano por el aporrepresor (trpR) sin desactivarlo. Sin embargo, se sabe que estos inductores tienen efectos secundarios sobre la triptofanil tRNA sintetasa, por lo que la utilidad de los mismos es cuestionable (21, 78). El promotor de trp es totalmente desreprimido en cepas mutantes que carezcan del producto del gene trpR, lo cual generalmente no es deseable ya que la biosíntesis incontrolada de proteínas puede afectar el crecimiento de la cepa (53).

Una característica importante del represor de trp es que regula la expresión de varios operones: el operón de trp, que codifica para las cinco enzimas responsables de la biosíntesis del triptofano; el operón aroH que codifica para una de las tres isozimas que llevan a cabo la reacción inicial de la vía común para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos; el operón trpR que codifica para el propio aporrepresor del sistema; y las vías biosintéticas de los aminoácidos isoleucina-valina, leucina, treonina y fenilalanina (10, 53). Dados estos efectos secundarios no es recomendable la utilización de cepas trpR para la sobreproducción de proteínas. Como se observa, la expresión controlada utilizando el promotor de trp es más difícil de obtener en relación a otros promotores como lacUV5.

A la fecha se han descrito dos tipos de vehículos moleculares que utilizan el promotor trp para expresar DNA en E. coli: aquellos que contienen la región atenuadora (27,

62, 94), y otros a los que se les ha deletado dicha región (9, 95). Es preferible prescindir de la presencia del atenuador para evitar la terminación prematura de transcritos en este punto.

Se ha reportado la obtención de altos niveles de biosíntesis de proteínas a partir del promotor de *trp* por Hallelwell y Emtage (40). En su sistema se utiliza la secuencia reguladora de la transcripción, incluyendo el atenuador, para sintetizar los productos de los genes *trpE* y el 15% del gene *trpD* de dicho operón en un plásmido multicopia. Mediante la inducción del sistema con ácido indolacrílico se obtiene un incremento del producto del gene *trpE* (el componente 1 del complejo de la antranilato sintetasa) de aproximadamente 50 veces con respecto al estado no inducido. Estos altos rendimientos hacen de la región regulatoria de *trp* un candidato adecuado para dirigir la síntesis de las nuevas proteínas híbridas.

Uno de los métodos que se han desarrollado para el análisis *IN VIVO* de la regulación de la expresión de genes consiste en fusionar regiones regulatorias a genes estructurales cuyos productos puedan medirse enzimáticamente. Con este fin, Close y Rodriguez (17) han construido una serie de cassettes o cartuchos de DNA que contienen el gene del transposón bacteriano Tn9 que codifica para la enzima transacetilasa de cloranfenicol (TACm). Este gene confiere resistencia a cloranfenicol a la bacteria que

lo porta (Cm^r). Este gene fue elegido para analizar las condiciones de inducción del promotor de trp por las siguientes razones:

1.- Se conocen sus secuencias de DNA (1) y de aminoácidos (85).

2.- La actividad enzimática de la TACm puede ser medida por medios espectrofotométricos (85), lo cual permitirá un análisis mas exacto de las condiciones de inducción del sistema, comparado con el análisis densitométrico.

3.- La enzima es fácilmente purificable por cromatografía de afinidad (84).

4.- Pocos organismos producen TACm, eliminando así el problema de actividades enzimáticas secundarias en el huésped (85).

5.- Existe dentro del gene estructural un sitio único de restricción reconocido por la enzima EcoRI. Al fusionar cada uno de los genes sintéticos en este sitio, se generarán dos genes nuevos que codificarán para las proteínas híbridas, ya que la fase de lectura de los fragmentos del DNA es la misma. Además, se ha detectado en minicélulas la biosíntesis de proteínas híbridas fusionadas en el mismo sitio de EcoRI (83).

6.- Comparado con beta-galactosidasa, un híbrido con la TACm tiene las siguientes características: 3 metioninas, lo que disminuye la cantidad de CNBr requerido para la liberación de las cadenas; ninguno de los péptidos generados por el rompimiento con CNBr tiene un peso molecular similar al de las cadenas; es de menor peso molecular; y contiene una sola cisteína (que puede cambiarse a otro aminoácido por mutagénesis dirigida del DNA de modo que pueda hacerse la reasociación de las cadenas antes de la reacción del CNBr y ver si así aumenta el rendimiento del proceso de reasociación). En la figura 12 se muestra la secuencia de aminoácidos esperada para los híbridos.

Una posible desventaja que tiene la utilización del gene de la TACm es que la frecuencia de uso de codones del mismo no es la óptima para E. coli (38). Sin embargo, la frecuencia de uso de codones en los genes *trpE* y *trpD* (utilizados por Hallewell y Entage) tampoco es óptima, y aun así obtienen una inducción de 50 veces. Esto sugiere que este punto no siempre es importante para los niveles de biosíntesis de proteínas.

A

Met Glu Lis Lis Ile Tre Gln Tir Tre Tre Val Asp Ile Ser Gln Trp His Arg Lis Glu
ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACC ACC GTT GAT ATA TCC CAA TGG CAT CGT AAA GAA

His Fen Glu Ala Fen Gln Ser Val Ala Gln Cis Tre Tir Asn Gln Tre Val Gln Leu Asp
CAT TTT GAG GCA TTT CAG TCA GTT GCT CAA TGT ACC TAT AAC CAG ACC GTT CAG CTG GAT

Ile Tre Ala Fen Leu Lis Tre Val Lis Lis Asn Lis His Lis Fen Tir Pro Ala Fen Ile
ATT ACG GCC TTT TTA AAG ACC GTA AAG AAA AAT AAG CAC AAG TTT TAT CCG GCC TTT ATT

His Ile Leu Ala Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Fen Met Gln Ile Val Glu Gln Cis
CAC ATT CTT GCC CGC CTG ATG AAT GCT CAT CCG GAA TTC ATG GGC ATC GTT GAA CAG TGT

Cis Tre Ser Ile Cis Ser Leu Tir Gln Leu Glu Asn Tir Cis Asn
TGC ACT TCT ATC TGC TCT CTT TAC CAG CTT GAG AAC TAC TGT AAC

B

Met Glu Lis Lis Ile Tre Gln Tir Tre Tre Val Asp Ile Ser Gln Trp His Arg Lis Glu
ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACC ACC GTT GAT ATA TCC CAA TGG CAT CGT AAA GAA

His Fen Glu Ala Fen Gln Ser Val Ala Gln Cis Tre Tir Asn Gln Tre Val Gln Leu Asp
CAT TTT GAG GCA TTT CAG TCA GTT GCT CAA TGT ACC TAT AAC CAG ACC GTT CAG CTG GAT

Ile Tre Ala Fen Leu Lis Tre Val Lis Lis Asn Lis His Lis Fen Tir Pro Ala Fen Ile
ATT ACG GCC TTT TTA AAG ACC GTA AAG AAA AAT AAG CAC AAG TTT TAT CCG GCC TTT ATT

His Ile Leu Ala Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Fen Met Fen Val Asn Gln His Leu
CAC ATT CTT GCC CGC CTG ATG AAT GCT CAT CCG GAA TTC ATG TTC GTC AAT CAG CAC CTT

Cis Gln Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tir Leu Val Cis Gln Glu Arg Gln Fen Fen Tir
TGT GGT TCT CAC CTC GTT GAA GCT TTG TAC CTT GTT TGC GGT GAA CGT GGT TTC TTC TAC

Tre Pro His Tre
ACT CCT AAG ACT

FIGURA 12: SECUENCIA DE AMINOACIDOS ESPERADA PARA LOS HIBRIDOS CON LA TRANSACETILASA DE CLORANFENICOL.

(A) TACm-cadena A
(B) TACm-cadena B

RESULTADOS

1) Construcción y caracterización de los plásmidos.

La enzima EcoR1 corta el gene de resistencia a cloranfenicol del transposón Tn9 (1) en la misma fase de lectura que tienen los genes sintéticos, por lo que fácilmente se pueden unir ambos fragmentos para construir un gene que codifique para los primeros aminoácidos de la TACm y los aminoácidos correspondientes a una de las cadenas de insulina. Para construir estos plásmidos se siguió la estrategia indicada en las figuras 13 y 14 .

A partir del plásmido pBR709 se aisló un fragmento de DNA de 292 pares de bases que contiene el promotor, operador, inicio de la transcripción y sitio de unión a ribosomas (SD) del operón de triptofano (figura 15) (obsequio del Dr. Raymond L. Rodriguez). Este fue clonado en el sitio de EcoR1 del plásmido pJR11 (probador de promotores en el gene de resistencia a tetraciclina) (89) previamente polimerizados los extremos de ambos fragmentos de modo que se perdieran los sitios de EcoR1. El nuevo vehículo, denominado pBR702, aporta al huésped que lo contiene resistencia a Tc.

El siguiente paso fue la clonación del gene de Cm^r en el sitio de HindIII del pBR702 para producir el pBR703. Este

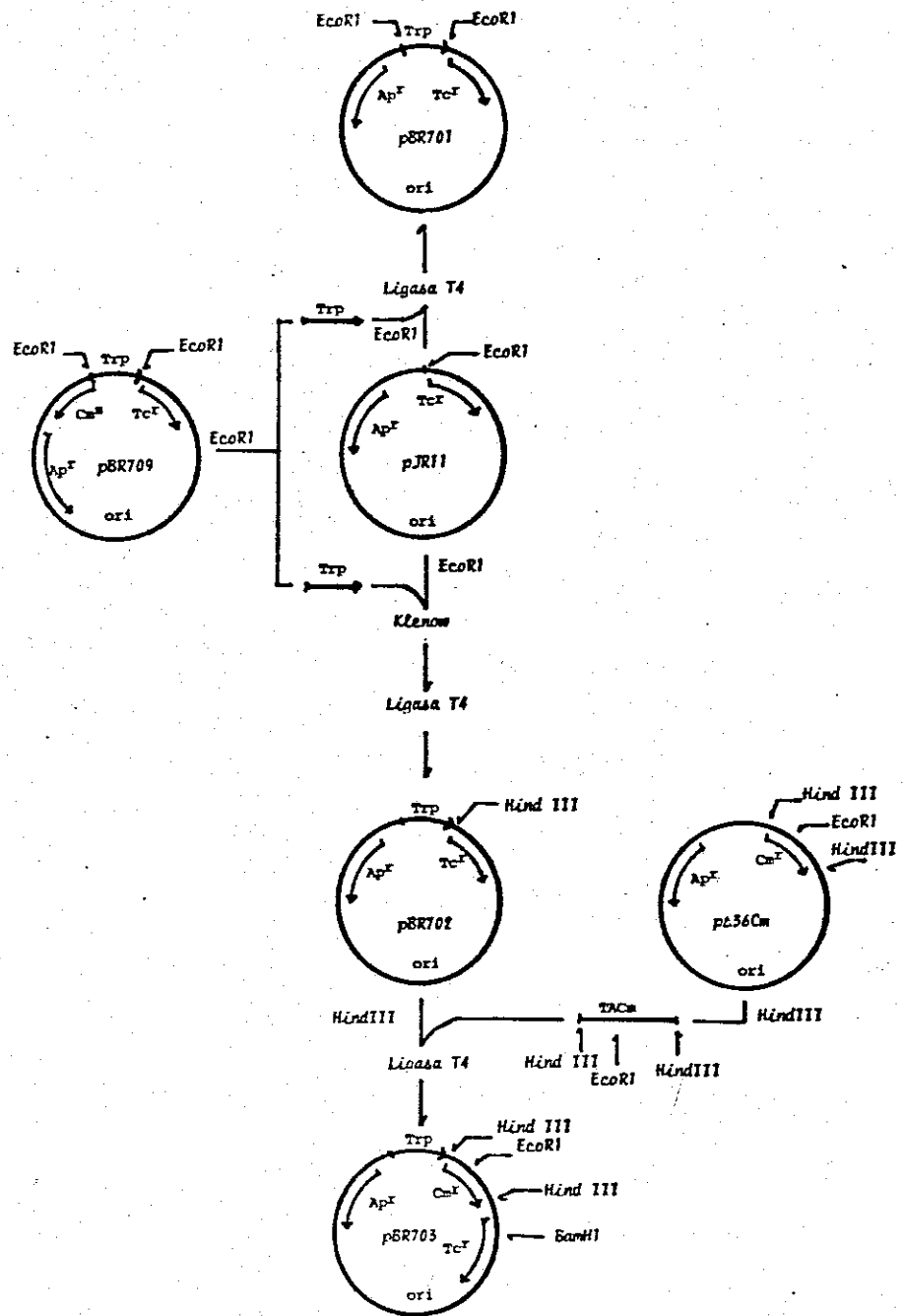


FIGURA 13: CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pBR703 QUE DIRIGE LA SINTESIS DE LA TAC_m A PARTIR DEL PROMOTOR DE TRIPTOFANO.

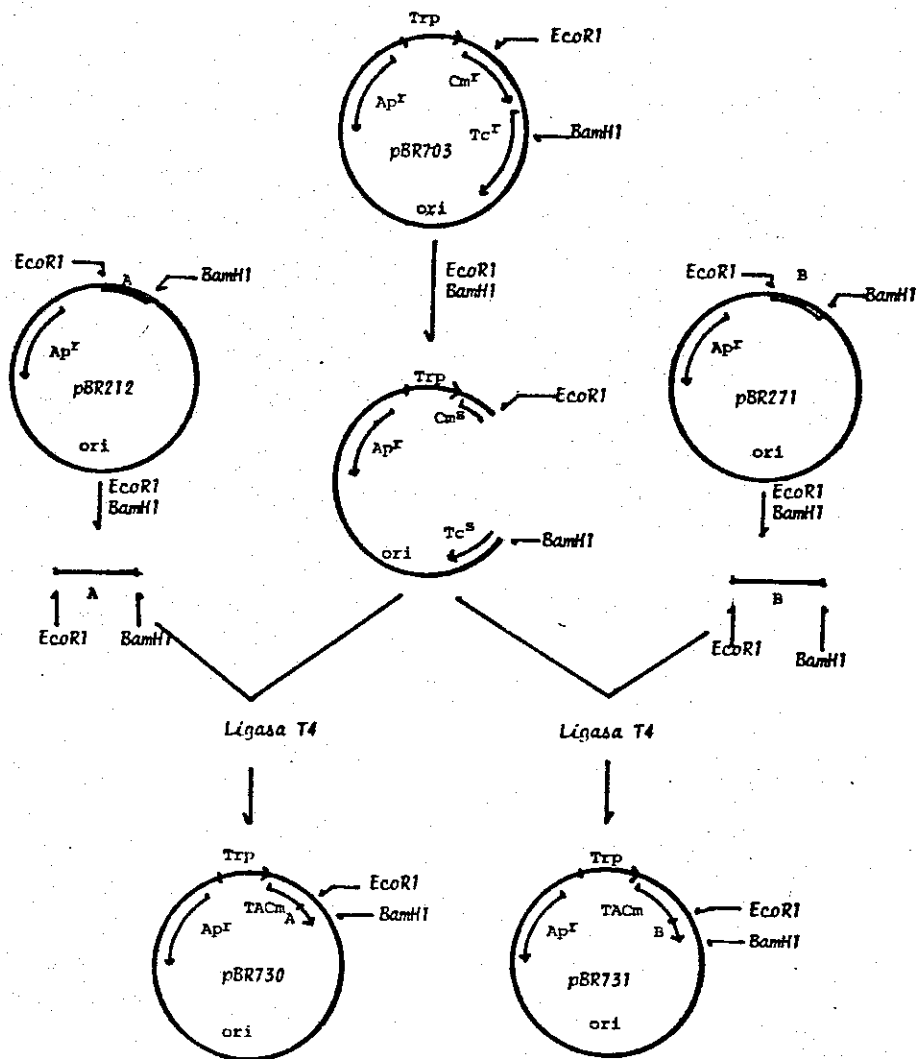


FIGURA 14: CONSTRUCCION DE LOS PLASMIDOS QUE DIRIGEN LA SINTESIS DE LAS CADENAS A Y B DE INSULINA EN FORMA DE PROTEINAS HIBRIDAS CON LA TAC_m A PARTIR DEL PROMOTOR DE TRP

Una vez construido el plásmido pBR703 (figura 13) se procedió a clonar en éste los genes sintéticos entre los sitios de EcoRI (sitio interno del gene de Cm^r) y BamHI (sitio interno de Tc^r). Se obtuvieron dos plásmidos que codifican para cada uno de los dos híbridos: el pBR730 (TACm-A) y el pBR731 (TACm-B) (figura 14). En la figura 17 se muestra un análisis esquemático de las distancias entre los sitios de restricción esperados de los fragmentos modificados de los plásmidos; y en la figura 18 se muestran los patrones de restricción de todos los plásmidos construidos.

2) Estudios de inducción del promotor de trp.

En algunas investigaciones sobre la expresión de genes que se transcriben a partir del promotor de trp (25, 32, 40) se han utilizado diversos medios de cultivo y diferentes concentraciones de triptofano e inductores químicos de dicho promotor. Así se busca alcanzar niveles mas elevados de biosíntesis de las proteínas codificadas por dichos genes. En los trabajos citados se utilizan básicamente dos condiciones de inducción: la adición de ácido indolacrílico (IAA) en el medio de cultivo o bien el ayuno de triptofano para la desrepresión del promotor. Dado que no existen datos publicados que indiquen cuál de los dos métodos representa

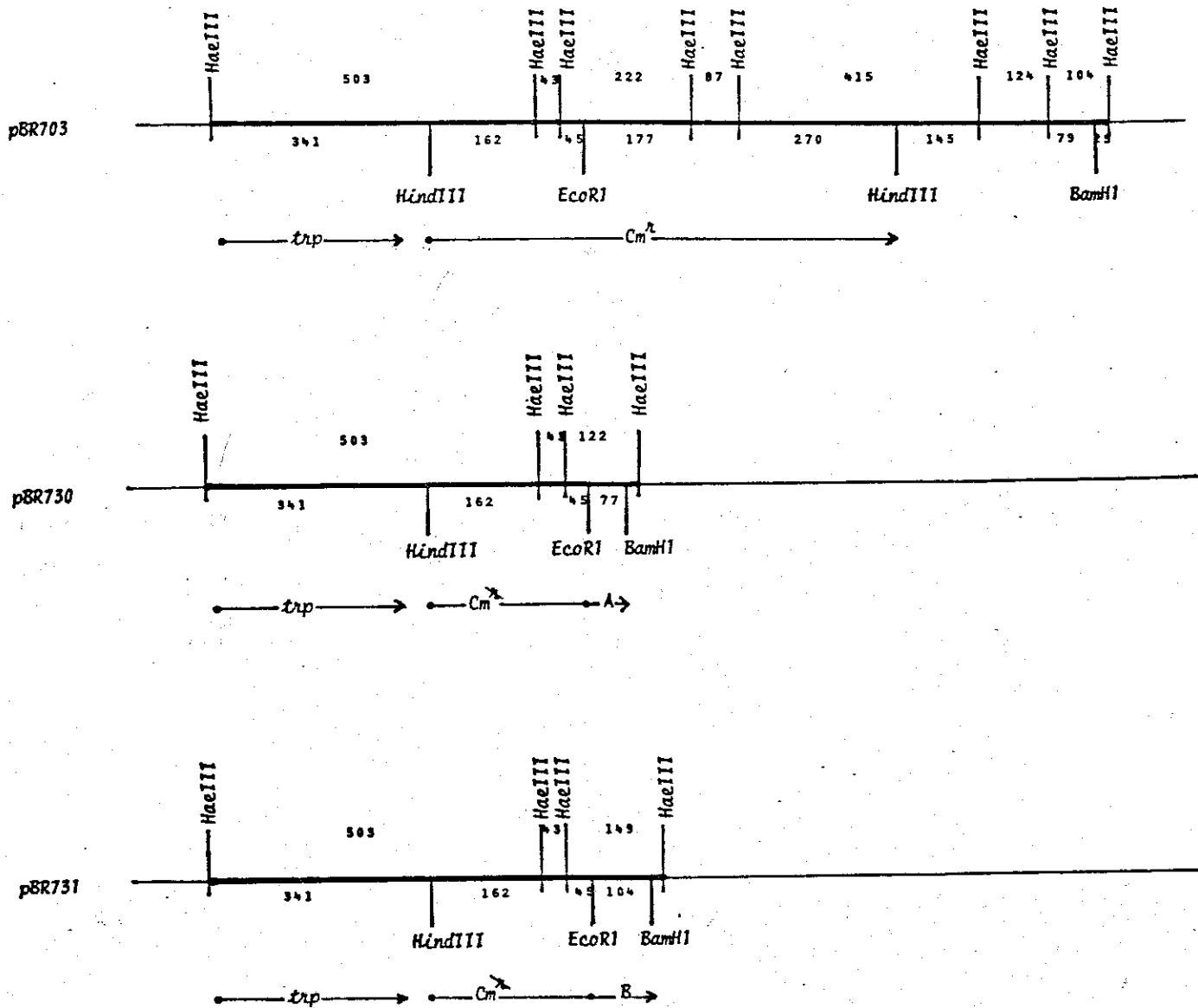


FIGURA 17: ESQUEMA DE LAS DISTANCIAS TEORICAS DE LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN DE LOS PLASMIDOS QUE CODIFICAN PARA LOS HIBRIDOS CON TACm.

A = cadena A de insulina
 B = cadena B de insulina

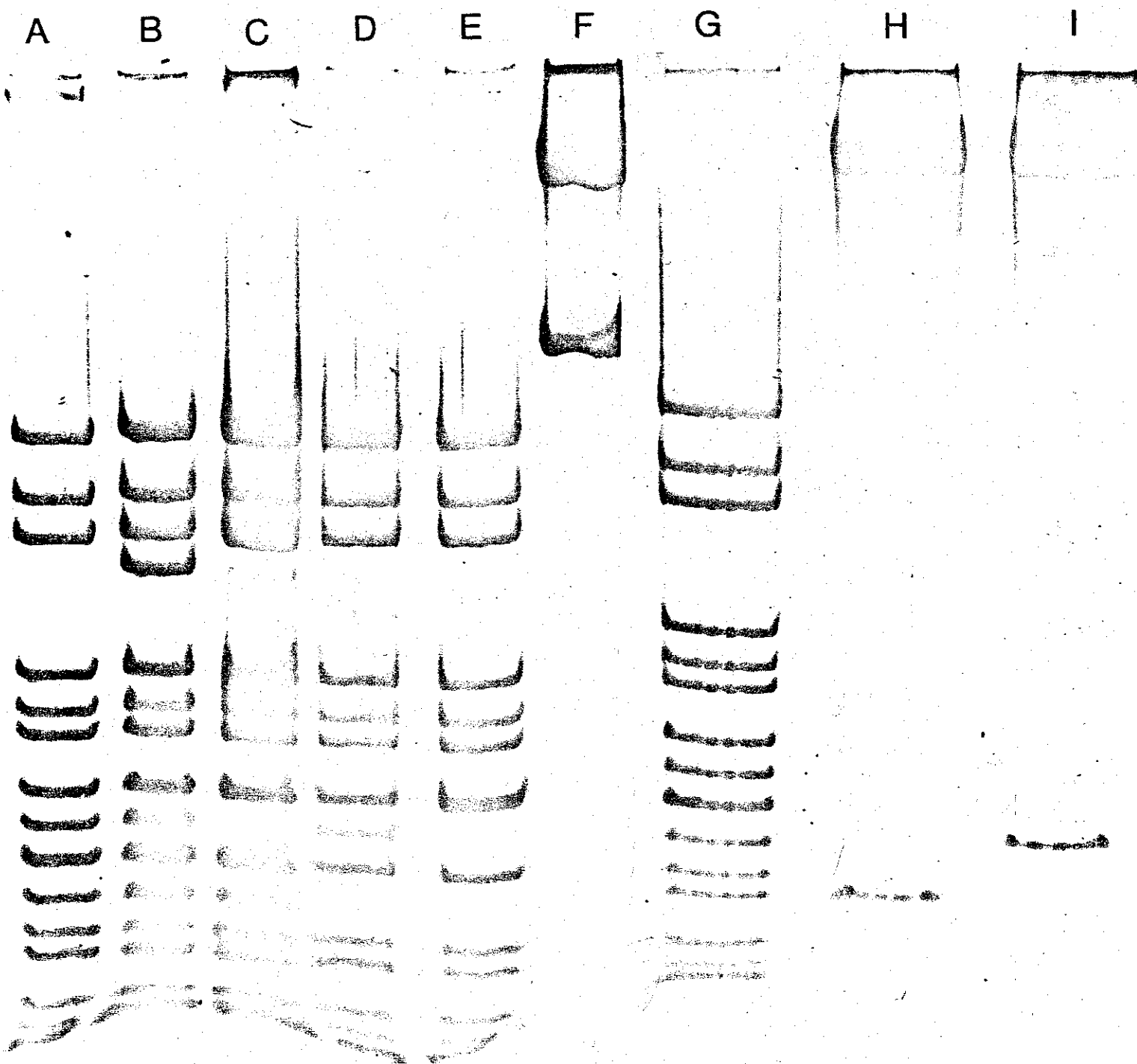


FIGURA 18: PATRONES DE RESTRICCION DE LOS PLASMIDOS CONSTRUIDOS.

- | | |
|--|-----------------------------|
| (A) pJR11/ <u>Hae</u> III | (B) pBR702/ <u>Hae</u> III |
| (C) pBR703/ <u>Hae</u> III | (D) pBR730/ <u>Hae</u> III |
| (E) pBR731/ <u>Hae</u> III | (F) pBR703/ <u>Hind</u> III |
| (G) pJR11/ <u>Hae</u> III | |
| (H) pBR730/ <u>Eco</u> R1- <u>Bam</u> H1 | |
| (I) pBR731/ <u>Eco</u> R1- <u>Bam</u> H1 | |

mas ventajas, se decidió trabajar ambos con el fin de hacer un análisis comparativo de los niveles de inducción obtenidos.

En el pBR703 se encuentra el gene que codifica para la TACm bajo el control de trp. Por tanto, el funcionamiento del promotor puede evaluarse midiendo la actividad de la enzima por el método reportado por Shaw (85). El principio de acción de dicho método se basa en que al entrar en contacto el cloranfenicol (Cm) y la acetil coenzima A en presencia de la TACm, esta última acetila el Cm liberando un grupo CoA sulfhidrilo (CoA-SH). La reacción de la CoA reducida con 5, 5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzónico (DTNB) produce un compuesto amarillo que absorbe a 412 nm. Al conocer el cambio de absorbancia antes y después de añadir el Cm, se puede calcular la actividad de la TACm en la muestra y al relacionarlo posteriormente con la cantidad de proteína total de la muestra se conoce la actividad específica de la muestra.

Como primer paso se decidió verificar la reproducibilidad del método. Para esto se probaron diversos lotes de acetil CoA con la misma muestra y los mismos reactivos, encontrándose que la actividad varía según el lote de acetil CoA utilizado. Con un mismo lote de acetil CoA se encontró que la actividad específica es constante cuando se mide la misma muestra por triplicado y que la actividad específica es constante también cuando se miden diluciones de la misma

muestra. De esto se concluye que los valores de actividad específica de la TACm solo son comparables cuando se utiliza el mismo lote de acetyl CoA. Además, el método permite trabajar en un amplio rango de concentración de enzima.

Una vez conocidas las limitaciones del método, se procedió a plantear los experimentos para estudiar los dos tipos de inducción de trp. Las condiciones se fijaron de acuerdo a lo reportado en la literatura con el fin de reproducir los resultados de inducción. Estas condiciones fueron:

1.- Inducción con ácido indolacrílico (IAA).- Se creció toda la noche (ON) la cepa MC1061 con el pBR703 en medio M-9 con 200 $\mu\text{g/ml}$ de triptofano (esta concentración de triptofano mantiene reprimido al promotor) (58). El cultivo se centrifugó, se lavó 2 veces con M-9 con 2 $\mu\text{g/ml}$ de trp y se diluyó 1:20 en el mismo medio. Al llegar a una $\text{DO}(580) = 0.3$, se adicionó el inductor a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ (40) y se tomaron alícuotas del cultivo hasta que este llegó a fase estacionaria. A estas alícuotas se les determinó la actividad específica de la TACm.

2.- Inducción por ayuno de triptofano.- Se creció ON en LB la cepa MC1061 transformada. Se centrifugó y se inoculó medio LB en una proporción 1:100. Cuando este cultivo llegó a una $\text{DO}(580) = 1.0$ se tomó otro inóculo para medio fresco M-9 con casaminócidos y se diluyó 1:25 (32). De este

cultivo se tomaron alícuotas para determinar también su actividad específica de TACm.

En la tabla 3 se muestran estos datos, de los que se puede concluir lo siguiente:

- En medio limitado de triptofano se obtiene una inducción ligera al añadir IAA.
- Con IAA se obtiene una inducción de aproximadamente 10 veces con respecto al estado no inducido (200 µg/ml de triptofano).
- Se observa una leve disminución de la actividad específica de la enzima cuando cambia la fase de crecimiento del cultivo.
- La actividad específica para la TACm codificada por el pBR328 es de 3.4 micromoles de cloranfenicol acetilados por minuto (20). Con este lote de acetil CoA se obtiene un valor de 2.95, por lo que suponemos que los valores numéricos están ligeramente bajos.

Estos experimentos fueron realizados por duplicado y se encontró una variación de los valores numéricos de ± 0.1 . Se repitieron con otro lote de acetil CoA y los valores

1		2		3		4	
DO	AE	DO	AE	DO	AE	DO	AE
0.234	1.96	0.25	1.82	0.205	0.010	0.202	0.73
0.300	1.14	*	*	0.310	0.015	0.290	1.81
0.386	0.73	0.39	0.81	0.405	0.014	0.410	1.68
0.543	2.75	0.55	3.30	0.605	0.297	0.590	2.30
0.710	4.03	0.70	5.40	*	*	*	*
0.861	3.99	0.87	4.80	0.830	0.490	0.830	4.10
0.960	3.41	0.99	3.92	*	*	*	*
1.160	3.70	1.10	4.25	1.070	0.510	1.080	3.92
*	*	1.19	4.74	*	*	*	*
*	*	1.25	4.91	1.360	0.560	1.320	3.93

* = valor no determinado

DO = densidad óptica del cultivo

AE = actividad específica (U TACm/mg de proteína)

TABLA 3: DISTINTAS CONDICIONES E INDUCCION DE LA CEPA MC1061 CON EL pBR703.

- (1) M-9, 2 µg/ml trp
- (2) M-9, 2 µg/ml trp, 20 µg/ml IAA
- (3) M-9, 200 µg/ml trp
- (4) M-9, 0 µg/ml trp

numéricos fueron mas bajos (pBR328 presentó una actividad específica de 2.53). El patrón de las curvas fue similar, observándose una disminución de los valores de actividad cuando cambia la fase de crecimiento del cultivo.

3) Biosíntesis de la TACm.

Los datos obtenidos de los estudios de actividad de TACm sugerían que a una $DO(550) = 0.7$ se tendría la mayor concentración de la enzima. Para comprobar esto se decidió analizar en un gel las proteínas obtenidas en condiciones de inducción con IAA. El volúmen total de la fermentación fueron 50 ml (crecidos en matraces de 500 ml) y las alícuotas fueron de 4.5 ml cada una. Los resultados se muestran en la figura 19. Puede observarse el fenómeno de inducción al comparar los dos primeros carriles con los demás, pero del tercero al octavo es difícil definir si hay mayor o menor proporción de la TACm con respecto a las demás proteínas. En el carril 9 se muestra un extracto del cultivo crecido en alto triptofano y se observa que hay represión del sistema (no llega a ser total).

Se llevó a cabo la cuantificación densitométrica de la banda correspondiente a la TACm de cultivos crecidos toda la noche, y los resultados se muestran en la tabla 4. Se observa que el sistema inducido presenta un incremento de 3 veces con respecto al estado no inducido. Estos datos no van

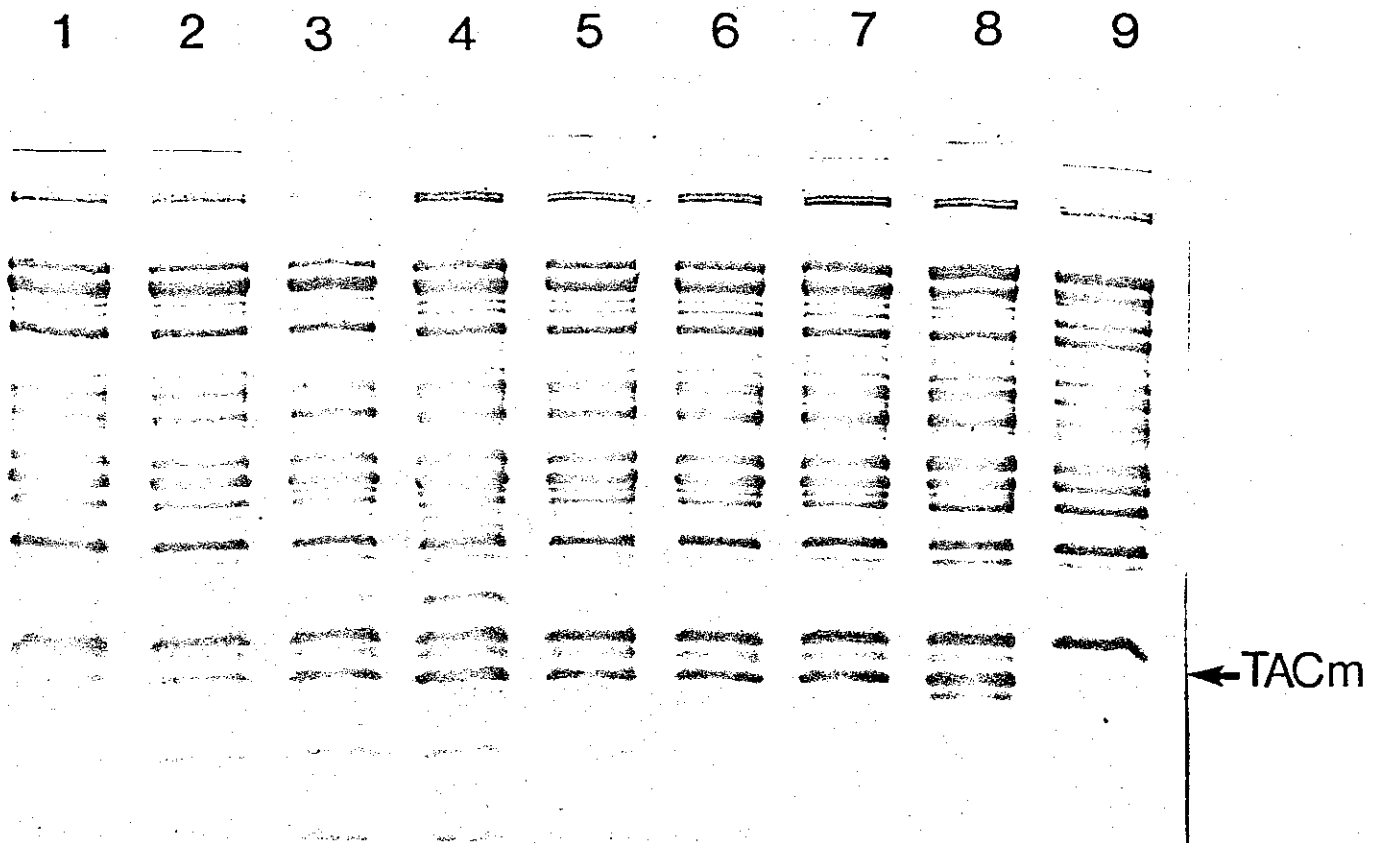


FIGURA 19: ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS CELULARES DE LA CEPA MC1061 CON EL pBR703 INDUCIDO CON IAA Y CON 2 ug/ml DE TRIPTOFANO. LAS DO(550) SON:

(1) 0.31	(4) 0.94	(7) 1.30
(2) 0.48	(5) 1.02	(8) ON
(3) 0.78	(6) 1.20	

(9) con 200 ug/ml de triptofano, ON.

CEPA Y CONDICIONES DE CULTIVO	TACm	OTROS
cepa silvestre con IAA	----	100 %
pBR703 con 200 ug/ml trp, sin IAA	4.16 %	96.84 %
pBR703 con 2 ug/ml trp, con IAA	12.21 %	87.79 %

TABLA 4: RESULTADOS DE LA DENSITOMETRIA DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA. LAS MUESTRAS SON DE CULTIVOS DE LA MC1061 SILVESTRE Y TRANSFORMADA CON EL pBR703 (ver figura 15).

de acuerdo con los datos de actividad enzimática presentados en la tabla 3, ya que se obtiene un incremento de 10 veces en actividad específica. Esto puede deberse a las limitaciones de la densitometría de geles que se explicaron anteriormente. Sin embargo, de acuerdo a la literatura se esperaba obtener un incremento mayor que 10 veces (40). Los posibles motivos por los que se obtuvieron tan bajos valores se discuten en las conclusiones de este capítulo.

4) Biosíntesis de las proteínas híbridas

Debido a que las proteínas híbridas no presentan actividad de TACm, la forma más directa de comprobar su biosíntesis es mediante la introducción de los plásmidos pBR730 y pBR731 en la cepa P678-56, productora de minicélulas. De esta forma se observan exclusivamente las proteínas codificadas por el DNA del plásmido. El peso molecular esperado para los híbridos es de 11 431 daltones para la TACm-cadena A y de 12 119 daltones para la TACm-cadena B.

En la figura 20 se muestra la autorradiografía del gel de minicélulas. En ambos carriles se observan tres bandas de proteínas en la parte superior del gel que corresponden a la beta-lactamasa y sus precursores (un control sin plásmido no muestra estas bandas). La diferencia entre las dos muestras radica en las bandas señaladas por las flechas, y

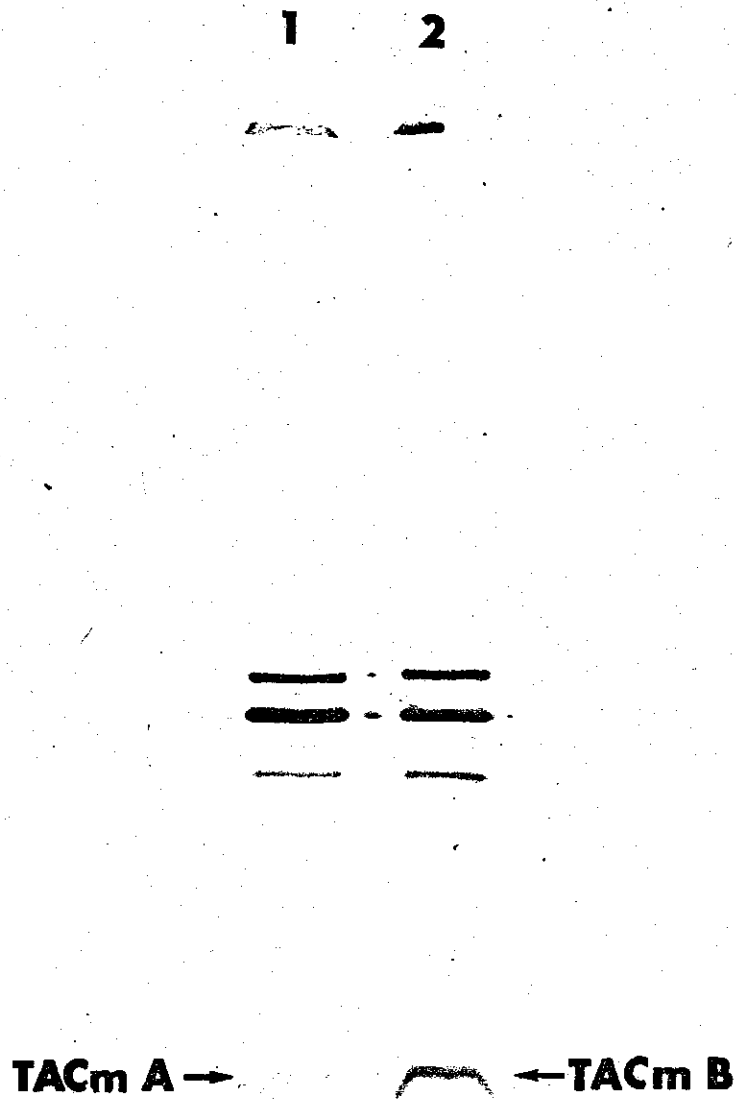


FIGURA 20: AUTORADIOGRAFIA DE UN EXTRACTO DE MINICELULAS TRANSFORMADAS CON LOS PLASMIDOS:

- (1) pBR730
- (2) pBR731

corresponden a la beta-lactamasa y sus precursores (un control sin plásmido no muestra estas bandas). La diferencia entre las dos muestras radica en las bandas señaladas por las flechas, y corresponden a la TACm-A (carril 1) codificada por el pBR730; y a la TACm-B (carril 2) codificada por el pBR731. Se observa que la banda de TACm-B es mas intensa que la de TACm-A. Esto no se debe a una diferencia en la incorporación de metionina radioactiva, dado que ambas proteínas tienen el mismo número de residuos. Es improbable que se deba a factores relacionados con la transcripción, pues ambos plásmidos tienen la misma secuencia reguladora. Se podría pensar que existe un mayor número de copias del pBR731 que del pBR730, pero las bandas que corresponden a la beta-lactamasa no presentan diferencias de intensidad. Esto sugiere que la diferencia de intensidad de las proteínas híbridas se debe a una distinta estabilidad del mRNA o de la proteína en sí, o a ambas cosas.

Una vez comprobado que los plásmidos sintetizan los híbridos, estos se introdujeron en la MC1061. Se sugiere que las condiciones de máxima inducción encontradas para el pBR703 deben servir para el pBR730 y el pBR731, ya que ni la región regulatoria de la transcripción ni el extremo 5' del mRNA han sufrido modificación alguna. Lo que sí puede cambiar es la DO del cultivo donde se obtenga la mayor concentración de los híbridos debido a que las estructuras de los mensajeros y las proteínas son distintas y no se sabe si su estabilidad será igual.

En la figura 21 se muestra el gel de la cepa MC1061 con el pBR730 y en la figura 22 se presenta la MC1061 con el pBR731. En ambos geles se incluyó un extracto de minicélulas transformadas con el plásmido respectivo con el fin de determinar la región aproximada del gel donde migra el híbrido. De esta forma, por sobreposición de una autorradiografía en el gel es posible, en algunos casos, definir cuál de las bandas teñidas con azul de Coomassie corresponde al híbrido. En los geles no se observa un incremento en la síntesis de los híbridos, ya que en la muestra de la cepa con plásmido crecida en condiciones de represión (carril 7) se observa la banda que posiblemente corresponde a la proteína híbrida con igual intensidad que en las muestras de la misma cepa con el plásmido crecidas en condiciones de inducción (carriles 3 a 6). Se esperaría que la cantidad de proteínas híbridas fuera aumentando como el caso de la TACm (figura 19), conforme aumenta la DO del cultivo. De los geles presentados en las figuras 21 y 22 no se puede concluir que hay producción de los híbridos.

Esto no significa que no hay inducción del promotor *trp* puesto que esto ya quedó demostrado en los experimentos con la TACm. Mas bien se sugiere la posible degradación de los mRNA, de las proteínas o de ambas, lo que explicaría que no se observan cambios en la intensidad de las bandas que pudieran corresponder al híbrido en condiciones de inducción.

1 2 3 4 5 6 7 8

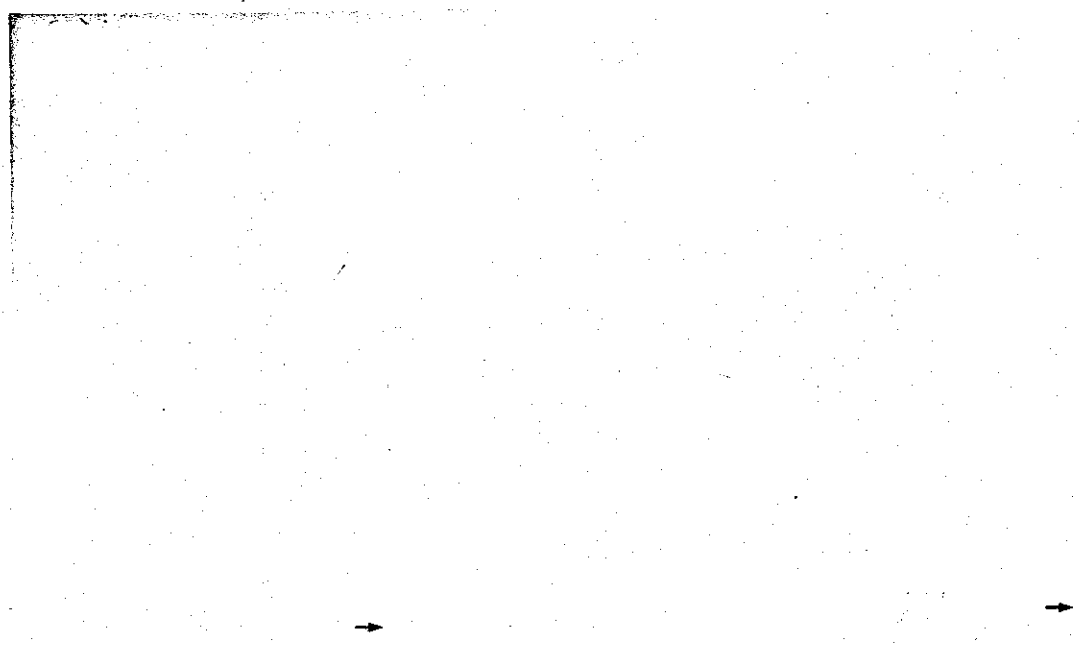


FIGURA 21: ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS CELULARES DE LA MC1061 Y MINICELULAS CON EL pBR730 (cadena A de insulina)

- (1) marcadores de PM de 12500 y 6500 d.
- (2) MC1061 + IAA DO= 0.7
- (3) MC1061/pBR730 + IAA DO= 0.575
- (4) " " " DO= 0.685
- (5) " " " DO= 0.800
- (6) " " " DO= 0.950
- (7) " " + 200 µg/ml trp, ON
- (8) minicélulas/pBR730

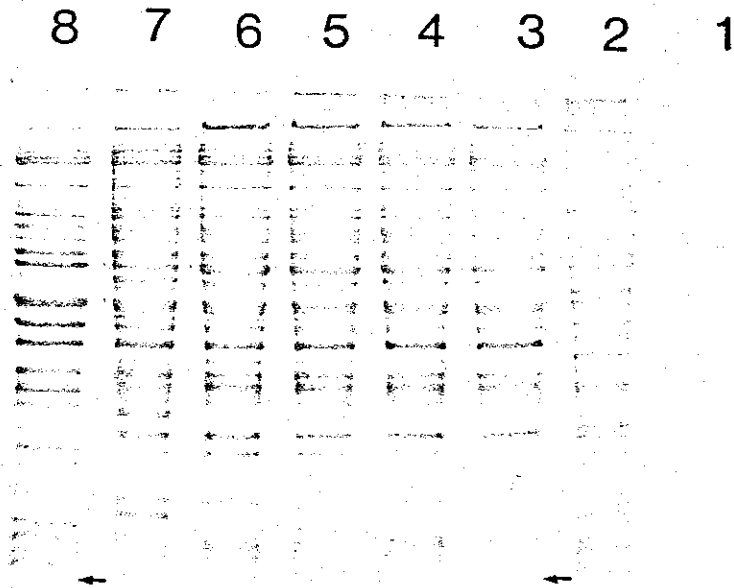


FIGURA 22: ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS CELULARES DE LA MC1061 Y MINICELULAS CON EL pBR731 (cadena B de insulina)

- (1) marcadores de PM de 12500 y 6500 d.
- (2) MC1061 + IAA DO= 0.7
- (3) MC1061/pBR731 + IAA DO= 0.55
- (4) " " " DO= 0.70
- (5) " " " DO= 0.87
- (6) " " " DO= 1.09
- (7) " " + 200 µg/ml trp, ON
- (8) minicélulas/pBR731

CONCLUSIONES SOBRE LA EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA TAC_m Y LAS CADENAS A Y B DE INSULINA HUMANA A PARTIR DEL PROMOTOR DE trp.

Se construyó el plásmido pBR703 que dirige la síntesis de la TAC_m a partir del promotor de trp. Con éste se llevaron a cabo los estudios preliminares sobre la inducción de la región regulatoria de trp y se concluyó que la inducción con IAA es mas eficiente que la inducción con ayuno de trp y en condiciones de máxima inducción se obtuvo un incremento en la biosíntesis, determinada densitométricamente, de 3 veces; y en la actividad específica de la TAC_m de aproximadamente 10 veces. El 12.21 % de las proteínas totales de un cultivo inducido con IAA y crecido toda la noche corresponde a la TAC_m.

El método de actividad enzimática utilizado para cuantificar la actividad del promotor en diferentes condiciones tiene la desventaja de que los valores numéricos obtenidos varían considerablemente según el lote de acetil CoA que se utilice. Por esto es necesario estandarizar los valores cada vez que se cambie de lote de acetil CoA, y dado que este es un reactivo de costo elevado este método pudiera llegar a ser económicamente prohibitivo si se requiere estudiar a fondo las condiciones de inducción del promotor en distintas cepas bacterianas.

A partir del pBR703 se construyeron el pBR730 y el pBR731 que dirigen la síntesis de los 2/3 de la TACm con las cadenas A o B respectivamente fusionadas a su extremo carboxilo terminal. Se observó la biosíntesis de estos híbridos en minicélulas pero en la cepa MC1061 no se puede concluir definitivamente sobre la biosíntesis de dichos péptidos.

A continuación se presenta una discusión de los factores transcripcionales y traduccionales que pueden haber influido en los niveles de biosíntesis de TACm, TACm-A y TACm-B. Dichos factores se explican y resumen en la introducción de este trabajo. Se discute por qué no se obtienen los altos niveles de biosíntesis reportados por Hallewell y Emtage (39) en el cual se utiliza la secuencia reguladora de la transcripción del operón de triptofano (incluyendo el atenuador) para sintetizar los productos de los genes *trpE* y el 15 % de *trpD* de dicho operón clonados en un plásmido multicopia. Mediante la inducción del sistema con ácido indolacrílico se obtiene un incremento del producto del gene *trpE* (componente I del complejo de la antranilato sintetasa) de 50 veces con respecto al estado no inducido.

En cuanto a los factores transcripcionales, ambos sistemas son iguales exceptuando la atenuación, la estabilidad del mRNA y el número de copias del gene. El sistema de Hallewell y Emtage tiene la región de atenuación

de la transcripción, la cual funciona como terminador prematuro de la misma. Es probable que debido a este mecanismo exista un menor número de mRNA por unidad de tiempo. El sistema diseñado no contiene esta región por lo que hipotéticamente deben sintetizarse un mayor número de transcritos.

El número de copias del gene depende directamente del número de copias del plásmido. En el sistema Hallewell-Emtage se utiliza el pBR322 como vehículo, el cual tiene 19.0 copias por célula; mientras que en nuestro sistema se utiliza el pBR327 que tiene 51.3 copias por célula (19). Al existir un mayor número de copias en este último, existe un mayor número de genes transcripcionalmente activos, lo que sugiere mayor cantidad de mensajeros.

Como se mencionó en la introducción, los factores que determinan la estabilidad del mRNA no están bien entendidos y se conoce que la cinética y tipo de degradación de éstos es variada y parece ser intrínseca de cada uno de ellos (3, 100). Dado que los mRNA producidos en dos sistemas son híbridos y no existen en la naturaleza, es imposible determinar su estabilidad A PRIORI. La falta de terminadores de la transcripción al final de los genes estructurales pudiera ejercer un efecto negativo en los niveles de biosíntesis de las proteínas, ya que la generación de mRNAs en sentido contrario a la replicación del plásmido pudiera

interferir con la replicación del mismo y por tanto disminuir el número de copias (29).

En cuanto a los factores traduccionales los dos sistemas son diferentes. El sistema Hallewell-Emtage utiliza la región silvestre de interacción entre mRNA y ribosoma. Contiene dos secuencias SD separadas por aproximadamente 130 pares de bases. El sistema diseñado tiene 3 secuencias SD posibles: una correspondiente al fragmento de DNA que contiene al promotor *trp* (figura 15) que se encuentra a aproximadamente 77 pares de bases del ATG del inicio de la traducción. Los otros dos corresponden al cartucho de TACm y se encuentran a 14 y 7 pares de bases del ATG respectivamente (figura 16). Datos preliminares de R. L. Rodriguez sugieren que la presencia de dos secuencias SD cercanas entre sí pueden afectar desfavorablemente la traducción de mensajes en *E. coli* (comunicación personal).

A pesar de que los plásmidos pBR703, pBR730 y pBR731 tienen la misma secuencia de interacción entre el mRNA y el ribosoma, se encuentra una gran diferencia en la obtención de TACm y de las proteínas híbridas. Esta evidencia sugiere que los factores de interacción entre mRNA y ribosoma son determinantes secundarios en la deficiente biosíntesis de estas proteínas híbridas.

En cuanto a la disponibilidad de tRNA, Grosjean et al.

(38) reportan que tanto la TACm como los 5 genes estructurales del operón de triptofano son débilmente expresados en E. coli dada la baja disponibilidad de tRNA para los codones de los mensajeros de estas proteínas. Dos tercios de los codones de los mRNA de las proteínas híbridas son de baja disponibilidad de tRNA (proviene de la TACm) y el otro tercio que corresponde a las cadenas A o B de insulina se diseñaron para tener una alta disponibilidad de tRNA. El paso limitante para la biosíntesis de los híbridos será por tanto la traducción del extremo amino terminal de la TACm.

La estabilidad de las proteínas puede ser un factor determinante de la baja biosíntesis de las proteínas híbridas ya que tanto la TACm como el producto del gene trpE han evolucionado por selección natural y son propias de E. coli mientras que los híbridos son extraños a la bacteria. Es posible que los sistemas de proteólisis de E. coli degraden las proteínas híbridas con mayor velocidad que a la TACm explicándose así las grandes diferencias de rendimiento observadas en los geles de proteínas.

Resumiendo, se sugiere que la inestabilidad de los mRNA, de las proteínas híbridas, o de ambos, sean los factores determinantes en los bajos niveles de biosíntesis de éstas.

No pueden preverse estos problemas en el diseño del

sistema, ya que es necesario construirlo para conocer el comportamiento del huésped ante la presencia de moléculas con una estructura totalmente diferente.

Una vez que se conoce el éxito o fracaso del diseño original, se pueden hacer modificaciones del sistema biológico basándose en el análisis del diseño del material genético y de la respuesta del huésped. En este caso, la cepa MC1061 demostró no ser adecuada para la biosíntesis de estas proteínas híbridas. Sin embargo, existen cepas en las que quizás los problemas de inestabilidad de mensajero y degradación de proteínas puedan verse disminuidos.

Cepas con el genotipo pnp estabilizan mensajeros de proteínas extrañas (42, 72) mientras que cepas lon (deficientes en un sistema de degradación de proteínas) (36, 93) pudieran disminuir también el efecto de la baja biosíntesis de los péptidos esperados. Resultados preliminares (R. Rosales, sin publicar) indican que el cepas pnp, la biosíntesis del híbrido TACm-B representa alrededor del 2 al 3 % de la proteína total. Cantidades pequeñas de este péptido han sido purificadas y tratadas para la obtención de la cadena B de insulina.

En cuanto a cambios en el sistema genético se recomienda manipular la secuencia de DNA del inicio de la transcripción de manera que solo exista una secuencia SD. Además debe

encontrarse la distancia óptima entre ésta y el ATG para así determinar si la biosíntesis de las proteínas híbridas aumenta debido a una mejor traducción del mensaje. Por otro lado, es recomendable clonar, después de los genes estructurales, un terminador de la transcripción que sea eficiente para evitar el problema de la interferencia con la función de replicación del vehículo.

CAPITULO 3

EXPRESION DEL cDNA QUE CODIFICA PARA EL INTERFERON HUMANO

El nombre de interferón se aplica a una familia de proteínas que se caracterizan por conferir un estado de resistencia viral en sus células blanco al inhibir la proliferación celular y modular la respuesta inmune. Para denominar a un péptido como interferón, este debe ser una proteína que ejerza una actividad antiviral a través de procesos metabólicos celulares que involucren síntesis de RNA y proteína (59).

Según su origen, se les clasifica en tres grupos:

- alfa : los de origen leucocitario
- beta : los de fibroblasto
- gama : los obtenidos de linfocitos

También se les puede nombrar como los de Tipo I que incluye al alfa y al beta, y como Tipo II que incluye al gama (109). Se define como una unidad de interferón a la cantidad que reduce en un 50 % la infección viral en aprox. 1000 células de un cultivo. La actividad específica típica es de 4×10^8 unidades de interferón por mg.

La disponibilidad de los diversos tipos de interferón a partir del desarrollo de técnicas de purificación, lo han hecho candidato para la terapia de varias enfermedades cuyo tratamiento por los métodos tradicionales no resulta muy eficiente, especialmente para terapias antitumorales y antivirales. Estas incluyen diversos tipos de cáncer, leucemia, hepatitis tipo B, influenza, difteria, conjuntivitis, dengue hemorrágico, esclerosis lateral amiotrófica, herpes simplex, herpes Zoster, encefalitis, encefalomielitis viral, poliarteritis nudosa, esclerosis múltiple, miopatía, artritis reumatoide, papilomatosis laríngea, mielomatosis, etc (55, 91, 96).

Dadas estas perspectivas alentadoras en cuanto a los usos terapéuticos de esta familia de proteínas, la producción de éstas es, en muchos países, de interés primordial. Los genes que codifican para los interferones han sido utilizados como modelos para el desarrollo de sistemas de expresión cada vez más eficientes, generando así una buena cantidad de conocimientos básicos sobre los factores que afectan la transcripción y la traducción de genes heterólogos en diversos huéspedes.

E. coli fue el primer huésped donde se introdujeron los genes de interferón con el fin específico de sobreproducir las proteínas. Estas se han expresado, no sólo como proteínas híbridas, sino también de manera directa, esto es,

sin formar proteínas de fusión. Entre los sistemas mas eficientes de expresión destaca el que utiliza el promotor de triptofano con su sitio de unión a ribosomas, ya que con este se han reportado buenos rendimientos (aprox. 600 ug por litro, o bien hasta 8×10^7 unidades de interferón) (13, 33). Otros promotores que se han utilizado son el de lac, fusionando el gene de interferón al gene lacZ del fago M13mp7 (88); y el promotor P L del fago lambda, cuya expresión puede regularse en cepas con represor termosensible (23); el promotor de la lipoproteína de E. coli (9); promotores sintéticos (104); y promotores híbridos contruidos en el laboratorio (9, 47).

Otros sistemas han buscado la expresión de estos genes en otros huéspedes, como son Bacillus subtilis y Saccharomices cerevisiae.

Bacillus subtilis fue transformado con un gene híbrido en el que la secuencia que codifica para el péptido señal de la alfa amilasa fue unido a la secuencia que codifica para el interferón humano maduro alfa2 (IFN α 2) (69). El híbrido es procesado precisamente después del último aminoácido de la señal de la alfa-amilasa, y es secretado a 0.5-1 mg por litro. (la alfa-amilasa se produce a nivel de varios gramos por litro, y es excretada normalmente por B. subtilis al medio, por lo que no existe acumulación del producto dentro del microorganismo).

Otro de los sistemas que se ha empleado es el de levadura (45, 97). En levadura las señales de iniciación y terminación de la transcripción son muy específicas, y *S. cerevisiae* no es capaz de procesar genes eucariotes con intrones. Para expresar un gene de mamífero en este sistema, es necesario que la secuencia codificadora de la proteína a expresar se encuentre bajo el control del promotor de levadura. Para maximizar la expresión en este sistema se fusionó el gene D leucocitario con unos pocos codones del gene de fosfoglicerato quinasa de levadura (que se regula con glucosa como fuente de carbono a nivel transcripcional). Se logran obtener 1×10^6 expó moléculas por célula.

CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GENE QUE CODIFICA PARA EL INTERFERON LEUCOCITARIO A O alfa 2

En el Departamento de Genética y Biología Molecular del CEINGEBI (UNAM), Guillermo Oliver llevó a cabo la clonación de un cDNA de interferón leucocitario humano tipo A o alfa2 (34, 68). Se aisló el mRNA total a partir de un mieloblastoma humano y posteriormente se construyó una colección de cDNAs utilizando un rastreador específico de DNA sintético que funcione como iniciador. Las clonas obtenidas fueron caracterizadas mediante patrones de

restricción, y aquella que presentó el patrón completo fue caracterizada hasta el nivel de secuencia nucleotídica con el fin de verificar que no hubiese ocurrido ningún fenómeno de mutación y que por tanto la secuencia codificadora estuviera intacta. La secuencia nucleotídica del gene, según lo reportado por Goëddel y colaboradores se muestra en la figura 23 (33). La secuencia determinada por Oliver se encuentra delimitada en esta figura por dos flechas. El plásmido construido se denominó pBR500.

Durante la clonación del cDNA que codifica para el interferón, aparecieron regiones de DNA a ambos lados del gene estructural que no correspondían a secuencias del vehículo o del gene (figura 24). Deleciones e inserciones como estas (aunque se trabajo con una cepa recA-) ya han sido reportadas. Fiers y colaboradores (30) utilizando metodologías similares a las utilizadas por Oliver, pero con el gene que codifica para interferón de fibroblasto, ha observado de igual forma fenomenos aberrantes durante la clonación, como es el hecho de encontrar plásmidos con insertos con una región 5' de cientos de pares de bases o con una duplicación parcial del extremo 3'. Una posible explicación de este fenomeno puede ser que las diferentes enzimas utilizadas en la construcción del cDNA no funcionan con la eficiencia que uno espera (transcriptasa reversa, polimerasa Klenow y nucleasa S1 principalmente) (26).

5' S1 met ala leu thr phe ala leu leu val ala S10
 TGA GCCTAAACCTTAGGCTCACCCATTTCACCCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA ATG GCC TTG ACC TTT GCT TTA CTG GTG GCC
50

S20 S23 1 10
 leu leu val leu ser cys lys ser ser cys ser val gly CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY SER ARG
 CTC CTG GTG CTC AGC TGC AAG TCA AGC TGC TCT GTG GGC TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG
100 ↑ 150

20 30
 ARG THR LEU MET LEU LEU ALA GLN MET ARG LYS ILE SER LEU PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLY
 AGS ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AAA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA
200

40 50 60
 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
 TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAI GAG ATG ATC CAG CAG
250 300

70 80
 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
 ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GGT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA
350

90 100 110
 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
 CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG
400 450

120 130
 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
 GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT
500

140 150 160
 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
 TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA
550 600

165
 SER LYS GLU
 AGT AAG GAA TGA AAC TGG TCAACATGGAAATGATTTTCATTAATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTTATGATCTGCCATTTCAAGACTCATGT
650 700

TTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAATGTTTTAGGAGTATTAATCAACATTGTATTCAGCTCTTAAGGCACTAGTCCCTTACAGAG
750 800

GACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTTAAAATATTATTTTAACTATTTATAAAACAACCTATTTTTGTTTCATATACGTCATGTG
850 900

CACCTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAAATATGTTCTTTGTATTGGTAA
950

3'

FIGURA 23: SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GENE QUE CODIFICA PARA EL INTERFERON LEUCOCITARIO ALFA-2 o A (33). (la secuencia de S1 a S23 corresponde a los aminoacidos del peptido lider).

El objetivo de este trabajo fue el de lograr la expresión de este gene a partir de la región de regulación del operón de triptofano (figura 15). La estrategia para la clonación de este fragmento de DNA se diseñó tomando en cuenta dos factores basicamente:

1.- Los 275 pares de bases que se comprenden entre el sitio de EcoRI y el inicio del gene que aparecieron como artefacto en la construcción y clonación del cDNA deben ser eliminados (68).

2.- La distancia del sitio de unión a ribosomas (SD) y el ATG de la iniciación de la traducción para este gene debe ser de 9 pares de bases (86).

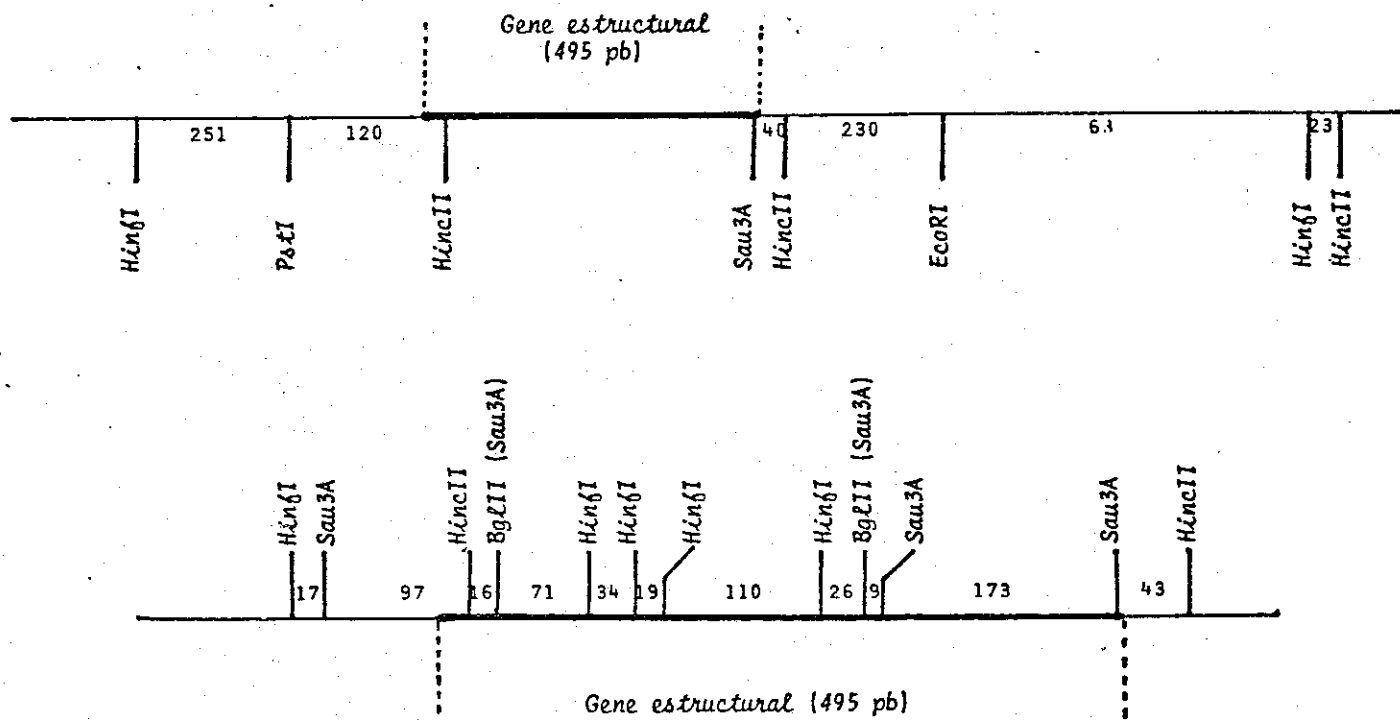
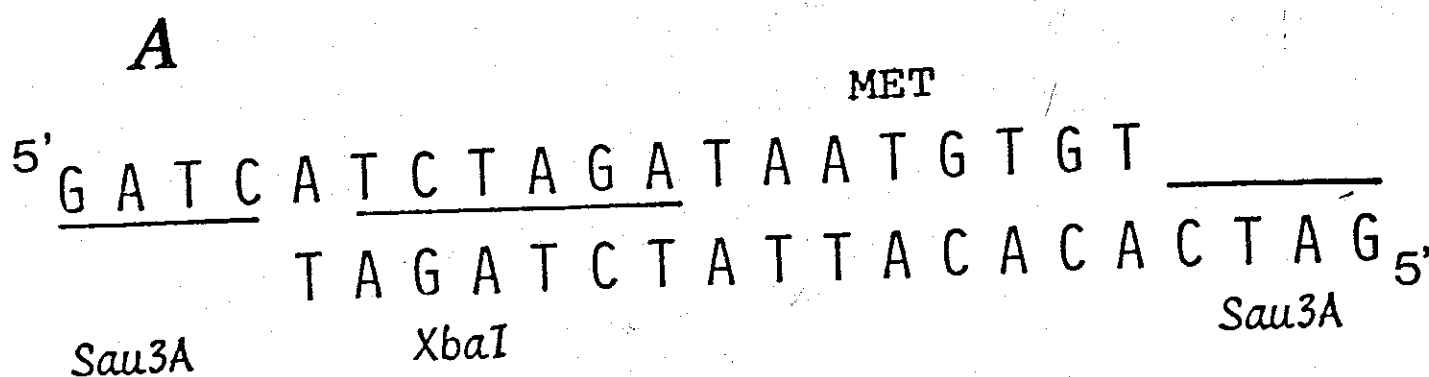


FIGURA 24: MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pBR500 QUE CODIFICA PARA EL INTERFERÓN HUMANO ALFA-2.

RESULTADOS

1) Diseño y síntesis de un "linker" o adaptador de DNA sintético.

Se diseñó un adaptador con el objeto de colocar en fase el promotor de trp y al cDNA de interferón. Este fue construido en el laboratorio del M. en C. Xavier Soberón y está constituido por dos oligonucleótidos de 19 pares de bases cada uno y su secuencia se muestra en la figura 25. Los sitios de restricción, así como su longitud fueron definidos en función de los pasos subsiguientes (se explicará más adelante).



B

FIGURA 25: SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS QUE CONSTITUYEN EL ADAPTADOR O "LINKER".

Este adaptador o "linker" sería clonado en el sitio de Sau3A dentro del gene estructural del interferón, a tres pares de bases del inicio de la traducción (figura 26), para lo cual el pBR500 fue digerido parcialmente con Sau3A en condiciones controladas de tiempo y temperatura. La fracción de moléculas lineales se purificó posteriormente para evitar en lo posible contaminación con fragmentos de bajo peso molecular.

2) Elección de la cepa receptora.

Se eligió la cepa de E. coli K12 MC1061 por su característica de transformabilidad, ya que es deseable la obtención de cuando menos 60 colonias para analizar. Así se tendrá un 95% de probabilidad de encontrar la buena (hay 10 sitios posibles de inserción, y el adaptador puede entrar en cualquiera de las dos orientaciones). Además, los estudios de inducción con el mismo promotor (capítulo 2) fueron realizados en esta cepa por lo que estas condiciones de inducción serán utilizadas también para la expresión del gene de interferón.

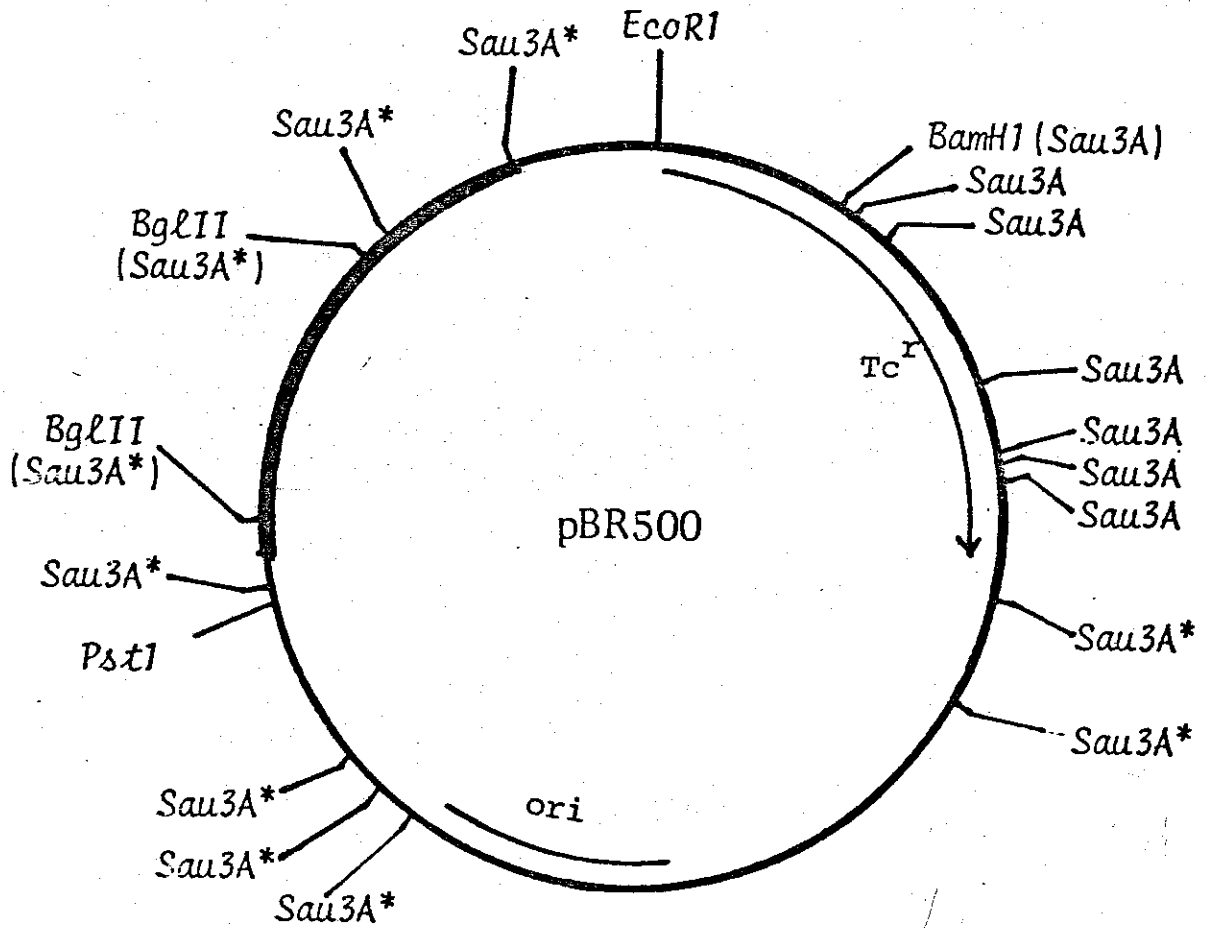


FIGURA 26: POSIBLES SITIOS DE INSERCIÓN DEL ADAPTADOR EN EL pBR500 (*).

3) Selección de las clonas portadoras del adaptador.

La mezcla de ligasa del pBR500 linealizado con Sau3A y el adaptador fue transformada en la cepa MC1061 y se seleccionaron las clonas portadoras de plásmido en un medio conteniendo 15 µg/ml de tetraciclina. Estas colonias fueron sometidas a hibridización en colonia con el fin de buscar aquellas en las que hubiera sido clonado el adaptador. Como rastreador se utilizó el oligonucleótido A (figura 25) marcado con ³²P alfa. De aproximadamente 250 colonias positivas se tomaron 60 para analizar.

El siguiente paso consistió en detectar aquellas colonias en las que el adaptador estuviera clonado en el sitio deseado (el primer sitio de Sau3A del gene). Los sitios marcados con * en la figura 26 son los únicos posibles de inserción del adaptador, ya que los otros corresponden al origen de replicación del plásmido o bien al gene de resistencia a tetraciclina. Esto se llevó a cabo mediante el análisis de los patrones de restricción del DNA de las colonias al digerirlas con EcoRI y XbaI simultáneamente. Aquellos patrones que presentaron una banda de aproximadamente 275 pares de bases indicaron que el adaptador fue clonado en la posición correcta. De las 60 colonias analizadas, 14 presentaron dicho patrón. Este número de colonias es bastante elevado, lo que sugiere que este sitio de corte es preferencial, o bien que hay colonias iguales o "siblings".

Por último, el DNA de estas 14 colonias fue digerido con la enzima HpaII y este patrón fue comparado con el del pBR500. Aquellas colonias que no presentaron un patrón idéntico fueron separadas, ya que cualquier irregularidad indica que existe una deleción en el DNA del plásmido (ocurrida durante la linearización del vehículo con Sau3A). Seis de las colonias fueron separadas y se procedió a trabajar con las ocho restantes. Como anteriormente se mencionó, el adaptador tiene dos extremos salientes reconocidos por Sau3A, por lo que pudo haber sido insertado en cualquiera de las dos orientaciones. Para determinar las clonas con la orientación correcta se procedió a clonar el fragmento de *trp* entre los sitios de EcoRI y XbaI de los plásmidos obtenidos, ya que solo en caso de estar en la orientación adecuada se llevará a cabo la biosíntesis del interferón.

4) Clonación del fragmento de DNA conteniendo el promotor de *trp*.

Se digirieron los DNAs de 2 colonias elegidas al azar con XbaI y EcoRI y se purificaron las bandas correspondientes al vehículo. Estas se ligaron por separado al fragmento de *trp* previamente purificado. Se eligió una colonia de cada experimento y se introdujo su DNA en la cepa productora de minicélulas (P678-54). Al analizar las proteínas

sintetizadas DE NOVO se encontró que una de las clonas era capaz de sintetizar una proteína del peso molecular esperado para el interferón. Este plásmido se denominó pBR502. En la figura 27 se muestran estos resultados. Para ver si el IAA tiene algún efecto sobre la biosíntesis de otras proteínas se utilizó como control el pBR701 (figura 13).

En la figura 28 se muestra la secuencia esperada para la región de unión de los tres fragmentos de DNA. Se observa lo siguiente:

- a) El sitio de SD correspondiente al promotor de trp.
- b) El sitio reconocido por XbaI mediante el cual se llevó a cabo la unión entre trp y el adaptador.
- c) El ATG de la iniciación de la traducción.
- d) La secuencia de aminoácidos correspondiente al extremo amino terminal del interferón.
- e) La distancia entre el SD y el ATG es de 9 pares de bases, que ha sido reportado como la óptima para este gene de interferón.

5) Inducción del pBR502.

Una vez demostrada la biosíntesis de un péptido de peso molecular similar al del interferón, se procedió a demostrar que la expresión de éste está controlada por el promotor de trp. Esto se llevó a cabo mediante la inducción del sistema

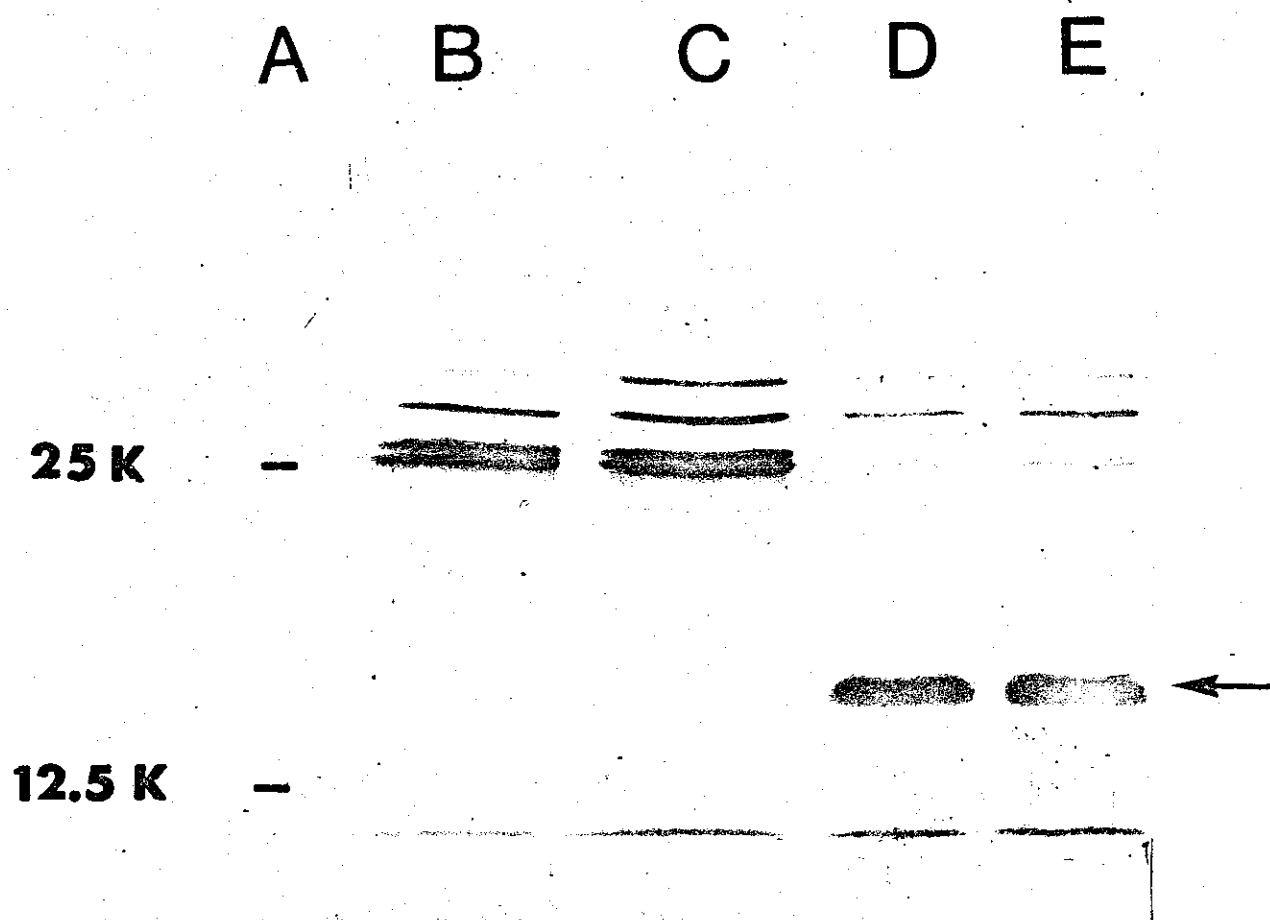


FIGURA 27: AUTORRADIOGRAFIA DE UN EXTRACTO DE MINICELULAS CON EL pBR502 (interferón)

(A) cepa silvestre (B) pBR701 (fig. 15)
 (C) pBR701 + IAA (D) pBR503 (trp -)
 (E) pBR503 + IAA

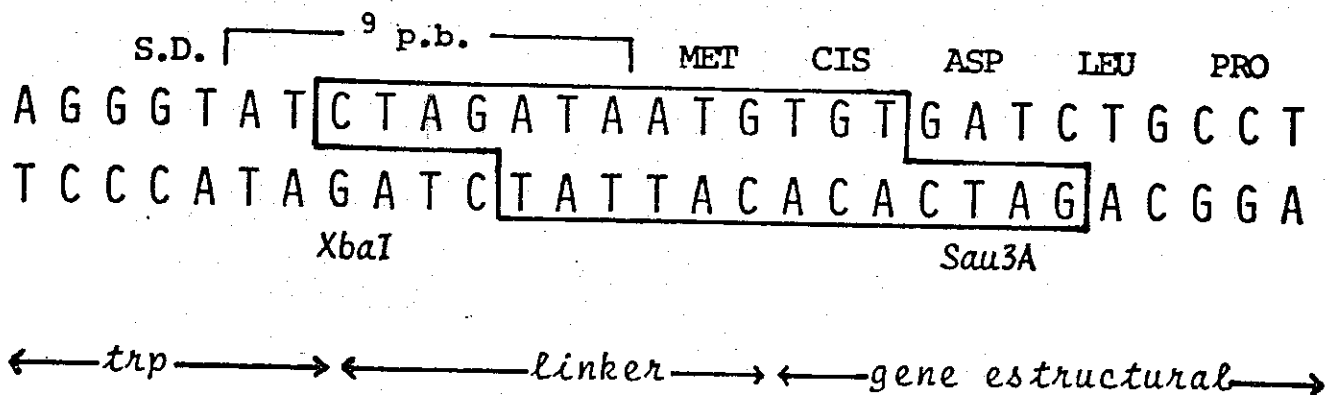


FIGURA 28: SECUENCIA ESPERADA PARA LA REGION DE UNION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA EN EL pBR502.

y el análisis de las proteínas biosintetizadas.

El sistema se indujo tanto por deprivación de triptofano como por adición de IAA. Dado que la síntesis de interferón es muy baja y no se observa por tinción de Coomassie, se decidió dar un pulso de metionina marcada con azufre 35 y así observar las proteínas sintetizadas DE NOVO. En la figura 29 se muestra la autorradiografía del gel donde se resolvieron extractos celulares conteniendo al pBR502.

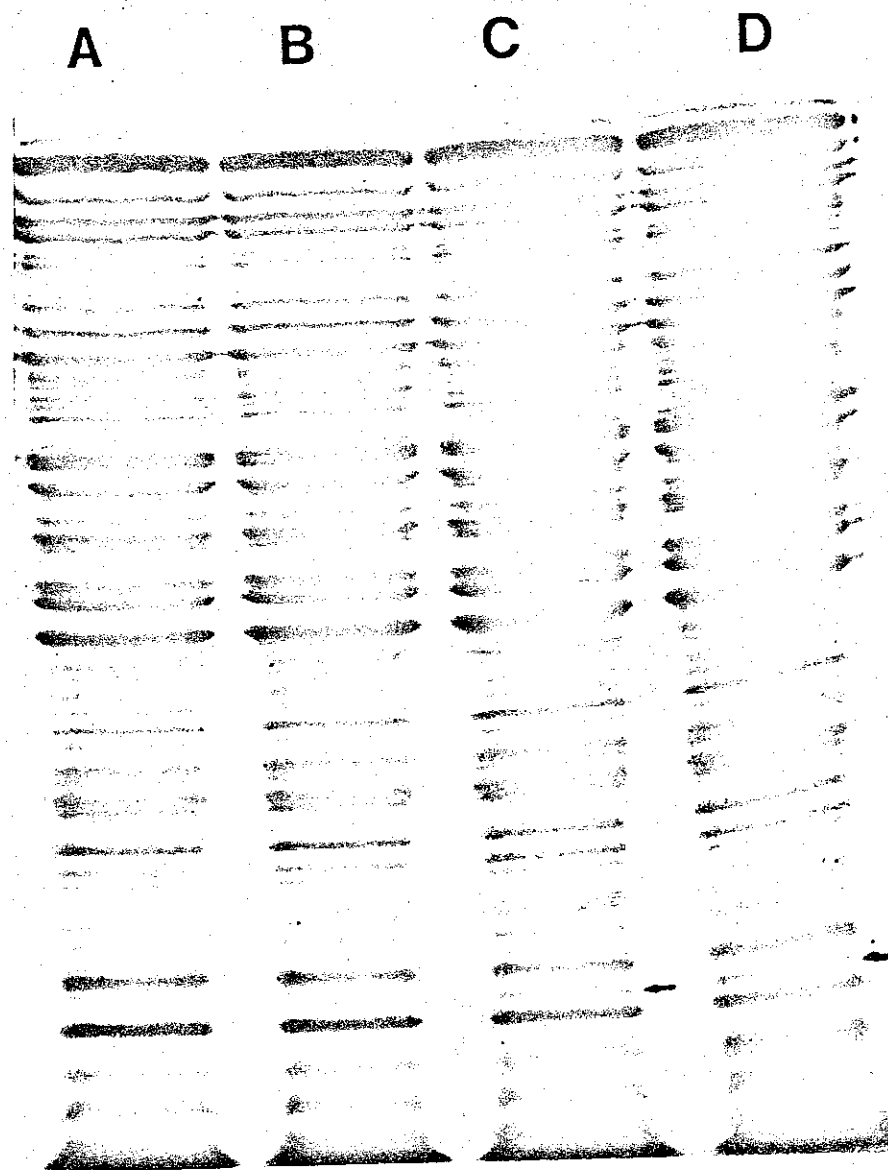


FIGURA 29: INDUCCION DEL pBR502 CON IAA.

- (A) MC1061
- (B) MC1061/pBR502 + 200 µg/ml trp
- (C) MC1061/pBR502 sin trp
- (D) MC1061/pBR502 sin trp + 20 µg/ml IAA

CONCLUSIONES SOBRE LA EXPRESION DEL INTERFERON A PARTIR DEL PROMOTOR DE trp

El sistema genético para la expresión del cDNA que codifica para el interferón leucocitario alfa-2 se diseñó con base en 2 consideraciones: la necesidad de eliminar un fragmento de DNA de 275 pares de bases que aparecieron como artefacto de la clonación del cDNA (68); y fijar la distancia entre el SD y el inicio de la traducción en 9 pares de bases (86).

Se construyó el sistema que dirige la síntesis del interferón a partir del promotor de trp mediante la inserción del fragmento de 292 pares de bases que contiene esta región de regulación (figura 15) en el pBR500. Para ajustar las distancias y permitir la futura manipulación del sistema, se utilizó un adaptador o "linker" de DNA sintético que pone en fase al gene estructural con el promotor. Este plásmido se denominó pBR502, y se demostró que a partir de él se sintetiza una proteína del peso molecular reportado para el interferón en la cepa productora de minicélulas.

Posteriormente se introdujo el pBR502 en la cepa MC1061, la cual fue crecida en las condiciones de máxima inducción para el pBR703 y en presencia de aminoácidos marcados para poder observar la síntesis del interferón. Para una construcción similar a la que se presenta en este trabajo se

ha reportado la obtención de 8×10^7 unidades de interferón por célula (32) o sea 600 μg por litro; por tanto no se espera ver la inducción del sistema en extractos celulares teñidos con azul de Coomasie.

Para las posibles mejoras del sistema se recomienda el uso de huéspedes pnp ya que al aumentar la estabilidad del mRNA se ha logrado elevar los niveles de obtención de proteínas eucariotes en E. coli. El sitio unico de XbaI inmediatamente anterior al gene permite la fácil manipulación del plásmido para poder insertar diferentes regiones de regulación de la expresión, lo que permitirá en el futuro la construcción de nuevos sistemas genéticos. Paralelamente, se está desarrollando en el laboratorio un método inmunológico para la cuantificación de este interferón, por lo que será posible comparar distintos niveles de expresión a partir de diversos promotores.

CAPITULO 4

DISCUSION

Una vez que se aisla un fragmento de DNA que codifica para una proteína en particular, derivado ya sea de fuentes naturales o sintetizado químicamente en el laboratorio, puede comenzar la manipulación necesaria para lograr la biosíntesis del péptido para el que codifica en el huésped adecuado.

Para el diseño básico de un sistema de expresión es de extrema importancia considerar el nivel de escalamiento al que se pretende llegar (laboratorio, planta piloto o industrial). La experiencia que se obtiene al desarrollar el trabajo hace que se vayan perfeccionando la construcción del vehículo de expresión, la elección de la cepa receptora, las condiciones de fermentación y los métodos de purificación del producto proteico a través de integrar el conocimiento que se vaya generando.

En este trabajo se analiza el diseño inicial y la construcción de dos sistemas alternativos de expresión para los genes sintéticos que codifican para las cadenas A y B de

insulina humana, y un sistema de expresión para el cDNA que codifica para el interferón humano A o alfa-2. Mediante estos sistemas se han logrado sintetizar las cadenas A y B de insulina y el interferón humanos. A continuación se analizarán algunos de los aspectos más importantes de la construcción de los sistemas que permitieron estas síntesis.

Se utilizaron dos regiones promotoras de la transcripción y, para contender con el problema de la degradación de péptidos sin sentido en E. coli, dos distintos fragmentos de DNA para la construcción de proteínas de fusión con las cadenas de insulina. Las características de estos sistemas se resumen a continuación.

Para la expresión de las cadenas, los promotores utilizados fueron lacUV5 y trp. Se sabe que trp es más fuerte que lacUV5 y ambos son regulables por sus respectivos represores. La biosíntesis de péptidos bajo la regulación de lacUV5 puede ser controlada en cepas sobreproductoras de represor ($lacI^q$) mediante la adición del inductor químico IPTG. Sin embargo, la regulación de la expresión de genes a partir del promotor - operador de trp es mucho más compleja debido a la acción múltiple que ejerce el represor sobre otras vías biosintéticas (aroH, trpR, leu, ilv, thr), y a la producción endógena del aminoácido triptofano. De hecho no puede lograrse la represión total del promotor y por tanto existe un nivel basal permanente de biosíntesis de proteínas

del operón de trp aun en condiciones de alto triptofano en el medio.

Conjuntamente al sistema de expresión se eligieron dos proteínas de fusión diferentes: en el caso de lac se utilizó un fragmento de 1,003 aminoácidos del extremo amino terminal de la beta-galactosidasa y en el caso de trp se utilizó un fragmento de 71 aminoácidos del extremo amino terminal de la transacetilasa del cloranfenicol (TACm).

Los híbridos con beta-galactosidasa presentan las siguientes características: ambas tienen un peso molecular de aproximadamente 135000 daltones, tienen 23 residuos de metionina en su configuración, se precipitan en medio acuoso y no presentan actividad de lactasa. Por otro lado, se encontró que el DNA que codifica para la beta-galactosidasa-cadena B es inestable en cepas lac i⁺, por lo que la biosíntesis de esta proteína solo ha sido lograda en una cepa lac i^q. Aparentemente la diferencia en secuencia nucleotídica dada por la región que codifica para la cadena B es suficiente para favorecer la pérdida de este DNA. Esta pérdida aparentemente aporta a las células donde se presenta, una ventaja selectiva sobre aquellas que conservan la capacidad de codificar para el híbrido intacto. Es importante mencionar que los híbridos beta-galactosidasa cadena A o B, representan del 25 al 30 % de la proteína precipitable total de los cultivos con estos plásmidos.

En cuanto a los híbridos con la TACm, ambos presentan las siguientes características: peso molecular aproximado de 12,000 daltones, 3 metioninas en su secuencia de aminoácidos y no presentan actividad de acetilasa. Datos preliminares (Ricardo Rosales, sin publicar) sugieren que ambas proteínas son solubles, o sea que no se precipitan al ser liberadas. Además los datos de biosíntesis de ambas en la cepa de minicélulas parecen indicar que la proteína híbrida con cadena A se produce en menor cantidad que la que se obtiene con cadena B en las mismas condiciones. Estos datos sugieren que el híbrido TACm-B o su mRNA pudieran ser más estables que el de la TACm-A (en esta cepa). Se habla de degradación de ambos ya que los datos obtenidos de la producción de TACm por el pBR703 indican que utilizando la misma secuencia reguladora de la transcripción, con una construcción idéntica entre ésta y el inicio de la traducción, cuando menos el 8% de la proteína total es TACm. Los híbridos con las cadenas deberían por tanto ser visibles en un gel de poliacrilamida al 15 % teñido con azul de Coomassie, y se demostró que este no es el caso. Ahora se sabe que el mRNA de los híbridos se degrada (Ricardo Rosales, datos sin publicar), ya que al utilizar cepas pnp se han obtenido rendimientos en la obtención de TACm-B (determinado densitométricamente) del rango del 3 % de la proteína total.

Si bien los resultados obtenidos con la cepa MC1061 parecían indicar que el sistema de beta-galactosidasa era

mejor en cuanto a la obtención final de producto, los datos obtenidos en la cepa pnp hacen necesaria una nueva evaluación de ambos sistemas. Aparentemente la purificación de las cadenas A y B a partir del híbrido de beta-galactosidasa es más compleja que a partir de los híbridos con TACm. Se sabe además que el promotor de lacUV5 es más débil que el de trp, lo que apuntaría hacia la elección del sistema de los híbridos de TACm. Sin embargo, el control de la expresión a partir de trp es mucho más compleja que a partir de lac, y la posible pérdida de los híbridos pudiera ser consecuencia de la transcripción basal del sistema cuando los cultivos no han llegado a fase exponencial (como caso análogo al caso de la beta-galactosidasa- cadena B en cepas lac i+). Ya que el problema principal es la deficiente regulación a nivel transcripcional, sugerimos la utilización de otra región promotora. Según datos reportados en la literatura, la elección se limita a promotores de dos tipos: el promotor P_L del bacteriófago lambda, el cual se puede regular en cepas con represor termosensible (este se inactiva al cambiar bruscamente la temperatura del cultivo de 30°C a 42°C), o alguno de los promotores híbridos que utilizan la región de -10 y el operador de lac (lo cual permite su regulación en cepas lac i^q), fusionados a la región -35 y a la región hacia arriba de ésta de otros promotores, como el de triptofano y el de los RNA ribosomales de E. coli (2, 7, 8).

El sitio de XbaI en el pBR730 y en el pBR731 es ideal para este propósito, ya que el fragmento que contiene la región de regulación de trp puede ser sustituido por otro fácilmente. Sin embargo, hay que considerar también que debe estudiarse el efecto que dos posibles sitios de unión a ribosomas (SD) pudieran ejercer sobre la traducción del mensaje. Probablemente se deba eliminar uno de ellos o ambos (si la nueva región elegida contiene uno), y además debe buscarse la distancia óptima entre el SD y el AUG del inicio de la traducción.

En el caso del sistema de expresión del interferón, el diseño se hizo de acuerdo a los parámetros óptimos reportados en la literatura (86). Por esto, la recomendación principal sería la utilización de nuevas regiones de regulación de la transcripción, así como la utilización de cepas pnp como huéspedes.

La producción de interferón presenta una gran ventaja con respecto a la producción de las cadenas de insulina, y esta es que no se necesita una proteína de fusión y por tanto no se requiere de la manipulación posterior del producto. En este sentido, la planeación de los procesos de escalamiento y purificación son mas sencillos, ya que se conocen las propiedades fisicoquímicas de la proteína, y el proceso de optimización del sistema debería ser mas sencillo.

En el mejoramiento de cualquier sistema de expresión, surge la necesidad de un método de cuantificación del producto deseado para poder evaluar objetivamente el efecto que tienen las alteraciones que se hagan al diseño primario del vector de expresión, las cepas utilizadas y las condiciones de cultivo de las mismas sobre los niveles de biosíntesis. El método que permita esto debe ser reproducible, y además económicamente accesible y fácil de manejar. No es sencillo contar con metodologías con dichas características. Generalmente se utilizan los siguientes métodos:

- La densitometría de geles, que permite conocer la proporción aproximada del producto protéico de interés con respecto a las demás proteínas. Puede hacerse de proteínas teñidas con algún colorante o bien marcadas radioactivamente (autorradiografía). En el primer caso, el problema es que no todas las proteínas se tiñen con igual intensidad, ya que esto varía con el contenido de los aminoácidos sobre los cuales ejerce su efecto el colorante. En el caso de las autorradiografías el problema es que debe utilizarse una mezcla de todos los aminoácidos radioactivos para que el marcado sea parejo. El costo de éstos es elevado y su manejo riesgoso. La densitometría es reproducible pero no se obtienen valores numéricos exactos, ya que los geles pueden saturarse y generalmente se obtienen valores mas bajos que los reales.

-La medición de otro producto que se transcriba simultáneamente al producto de interés. Este es un método indirecto y por ello hay que asegurar que los niveles de transcripción de ambos sean iguales. Sin embargo, la traducción de los mensajes no necesariamente es igual, ya que las regiones que codifican para cada proteína tienen sus señales regulatorias específicas.

- Diversos métodos que involucran el uso de anticuerpos específicos contra la proteína de interés. Estos son muy exactos y reproducibles, pero el manejo de los métodos no es muy sencillo especialmente con proteínas insolubles.

Los métodos utilizados para la cuantificación de los péptidos de las cadenas A y B fueron la densitometría de geles teñidos con azul de Coomasie y además la medición de un producto que se transcribe, si bien no de manera simultánea, si bajo las mismas regiones de regulación que los híbridos. Este producto es la enzima TACm.

Los resultados que arrojaron los experimentos de actividad enzimática no fueron satisfactorios, ya que la medición de la actividad de la TACm demostró ser muy sensible a la acetil CoA empleada. Esto hace indispensable la estandarización del método cada vez que se cambie de lote

de acetyl CoA, y dado que este es un reactivo caro e inestable, se sugiere la implementación de otro sistema para la evaluación de la biosíntesis de los péptidos. Los valores numéricos obtenidos de la densitometría no son exactos y es un método muy laborioso como para utilizarse en un proceso de optimización. Además, después de una cierta concentración de proteínas en un área, el gel se satura y no se pueden observar cambios sutiles en los niveles de biosíntesis de la proteína en cuestión. Este método no es, por tanto, adecuado para fines de mejoramiento de un sistema.

El diseño de estos vectores de expresión permitió determinar que los niveles de biosíntesis de los tres péptidos (TACm, TACm-A y TACm-B) son mas bajos que lo esperado y además sugieren fuertemente que las causas posibles de la casi nula biosíntesis de los híbridos son básicamente la inestabilidad del mRNA y de las proteínas. Gracias a estos resultados se han definido nuevas estrategias basadas en la utilización de cepas con genotipos específicos.

En cuanto al interferón, no se llevó a cabo la cuantificación de la biosíntesis de esta proteína, básicamente debido a la baja concentración de éste que se obtiene por litro de cultivo. El método recomendado para la cuantificación involucra el montaje de técnicas biológicas de inhibición del efecto citopático o bien de la utilización

de anticuerpos específicos y técnicas de radioinmunoensayo. Trabajos tendientes a esto se están desarrollando en el laboratorio.

Con el conocimiento básico actual y la experiencia que se obtuvo por el desarrollo de estos trabajos, se planteará el diseño teórico de lo que pudiera ser el sistema "óptimo" para la biosíntesis de proteínas heterólogas en E. coli.

El sistema genético de expresión generalmente se incorpora en un plásmido ya que estas unidades genéticas son fácilmente manejables. Uno de los problemas que pueden presentarse es la pérdida de éstos por segregación en un cultivo, por lo que sería deseable incluir en ellos una región que evitara dicho fenómeno. La región de partición o PAR del plásmido monocopia pSC101 es el candidato ideal para esto ya que se encuentra en un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases y se ha caracterizado totalmente (108).

El sistema genético deberá contar con una región regulatoria de la transcripción que sea lo mas fuerte posible, esto es que la velocidad de transcripción esté limitada exclusivamente por la velocidad de elongación de la cadena de mRNA. Este promotor debe estar eficientemente regulado, ya que la expresión del mismo sería letal para el huésped. Promotores con estas características son generalmente de bacteriófagos o bien algún promotor que

transcriba productos celulares muy abundantes, por ejemplo el promotor de los RNA ribosomales o de las lipoproteínas de E. coli. Es indispensable poner estos promotores bajo algún sistema de regulación eficiente.

El mensajero que se genere a partir del promotor no deberá presentar regiones de tipo de terminador con el fin de no provocar la terminación prematura de la transcripción. Además la región de Shine-Dalgarno deberá ser accesible a los ribosomas.

Es importante también el incluir terminadores de la transcripción al final de la región codificadora, ya que mensajeros muy largos pueden llegar a intervenir en la replicación del plásmido, sobre todo si la transcripción a partir del promotor fuerte va en sentido contrario a la replicación del plásmido (29).

En cuanto a las señales que permiten la traducción del mensaje, debe contar con un SD, el ATG de inicio y cuando menos un codón de terminación. La distancia entre el SD y el ATG, así como la secuencia entre ambos debe determinarse para cada mensajero. La región codificadora deberá utilizar los codones preferenciales del huésped, para lo cual puede ser deseable sintetizar químicamente el gene estructural. Esto no siempre es posible, ya que es difícil y costoso sintetizar eficientemente genes muy largos.

Es conveniente obtener la proteína de interés en forma nativa, ya que la creación de híbridos implica un tratamiento posterior para la liberación del producto deseado. Esto no siempre es posible debido a la inestabilidad de péptidos pequeños. Si no existe otra opción para la obtención de un péptido que la fusión de genes, el sistema deseable sería el de lograr una proteína estable, fácilmente purificable del resto de los productos celulares y que además contenga algunos residuos que permitan la disociación del péptido para liberar el fragmento deseado. No se puede determinar A PRIORI si un híbrido será estable, por lo que no hay otra opción que construirlo y estudiarlo. Sin embargo, el sistema de fusión a un fragmento del gene *trpE* pudiera ser el candidato a escoger (54).

Sería interesante incorporar al sistema otras propiedades. Por ejemplo, para facilitar la purificación pudiera diseñarse una proteína que contenga una región que sirva de "anzuelo", es decir, que aporte a la proteína alguna característica única que permita su aislamiento. Ejemplos de esto son las fusiones con fragmentos de genes que codifican para represores, ya que éstas presentan un dominio en la región amino terminal que permite la unión de dichas proteínas a DNA o bien fosfocelulosa. De esta forma los híbridos pudieran ser separados en un solo paso al unirlos a columnas de afinidad de DNA o fosfocelulosa. La

liberación del péptido de interés de su precursor peptídico es un problema difícil de resolver. Pueden utilizarse métodos químicos, como es el caso del rompimiento con CNBr en condiciones ácidas; o bien métodos enzimáticos, colocando residuos de aminoácidos que sean reconocidos como substratos. Un ejemplo de esto es la utilización de tripsina y catepsina B para romper enlaces de aminoácidos básicos. En cualquier caso, existe la limitación importante de que no deben existir en el péptido de interés, residuos que sean blanco del agente proteolítico. El método de CNBr tiene la ventaja de ser altamente específico, no así los métodos enzimáticos que pueden reconocer ciertas combinaciones de aminoácidos en forma secundaria. Sin embargo, el manejo del CNBr es peligroso, por lo que se necesitan condiciones controladas para trabajarlo. Sería interesante diseñar un método nuevo para sobrepasar este problema, aunque esto no es tarea sencilla.

La limitación principal en cuanto a la elección de una cepa receptora es que debe contener el genotipo necesario para la regulación de la transcripción y la degradación de proteínas y nucleicos. Una cepa ideal sería aquella que además de permitir el control de la expresión, no degradara el mRNA y las proteínas nuevas (de preferencia mediante mecanismos de temperatura, esto es que la cepa presentara mutaciones termosensibles), que tuviera una elevada velocidad de crecimiento y que fuera fácilmente manejable.

Como esto es muy difícil de obtener, ya que no se conocen bien los mecanismos mediante los cuales se estabilizan los productos de la expresión, se debe dar versatilidad al vector de expresión. El hecho de incluir más de un sistema de control frente al gene estructural amplía las posibilidades de la elección de huéspedes. Por ejemplo, pueden colocarse entre el promotor y la región codificadora, dos o tres operadores que sean regulables en distintas cepas y con distintos inductores.

Estas son algunas consideraciones en el planteamiento de un sistema ideal de biosíntesis de proteínas en E. coli. Como se observa, el diseño y construcción de un sistema ideal no es fácil, ya que se desconocen algunos de los factores que influyen en la sobreproducción de proteínas a partir de plásmidos, así como los mecanismos celulares de degradación de proteínas y mRNA.

La optimización de un sistema biológico no es un proceso terminal, ya que cualquier sistema es mejorable a través de integrar nuevos conocimientos. Es tarea indispensable la evaluación constante del mejoramiento de un sistema, de modo que exista un ajuste entre el costo y el tiempo que conlleva un proceso de este tipo, con respecto al progreso obtenido. Aquí el punto es hasta dónde se puede mejorar un sistema biológico y si vale la pena o no hacerlo.

En el caso de las cadenas de insulina, es claro que las regiones de regulación que se manejaron no fueron las mejores por los problemas que se mencionaron anteriormente. En este sentido, las proteínas híbridas con TACm merecen una segunda oportunidad, ya que las ventajas que presentan respecto a los híbridos de beta-galactosidasa son claras. Se continuará el trabajo con estas cepas productoras hasta el punto de cambiar la región regulatoria y la cepa receptora para ver si hay un incremento en la biosíntesis. Si este es el caso, se modificará la zona de interacción del mRNA y el ribosoma, y paralelamente se evaluará el posible cambio por mutagénesis dirigida del único residuo de cisteína del fragmento de la TACm por otro aminoácido para ver si se facilita la posterior reasociación de las cadenas previo al tratamiento de CNBr, para la obtención de insulina activa.

Para el interferón, se colocará una nueva región de regulación de la transcripción en lugar de trp dado que este promotor es difícil de regular.

El problema que todavía falta por resolver es el de montar las técnicas que permitan la cuantificación exacta de los productos. Mientras tanto se utilizarán las técnicas que se reportan en este trabajo.

Como comentario final queda remarcar el hecho de que un proceso de "optimización" lleva mucho tiempo, y gran parte

del valor de un trabajo de este tipo estriba en la experiencia que se obtiene durante el desarrollo del mismo. El conocimiento que se va generando a través del manejo de diversas estrategias y metodologías nos permitirá en el futuro, diseñar nuevos y más eficientes sistemas para la biosíntesis de proteínas en E. coli.

CAPITULO 5

MATERIALES Y METODOS

1) Generales

1.1) Cepas y medios de cultivo.- La cepa de E. coli K-12 MX614 (pro^- ; iso^- ; val^- ; $B1^-$; $\Delta lac(i,p)$) fue construida en el laboratorio del Dr. F. Bastarrachea a partir de la cepa CSH41 (65). La cepa sobreproductora del represor de lactosa, E. coli D1210 (lac^+ (i^q , z^+ , y^+)) es derivada de la HB101 y fue construida por J. Betz y J. Saddler (31). La cepa de E. coli MC1061 ($araD139$, $\Delta (ara,leu)$ 7697, $lacX74$, $galU^-$, $galk^-$, hsr^- , hsm^+ , $strA$) que es facilmente transformable con DNA de plásmido fue construida por Casabadian y Cohen (14). La cepa productora de minicélulas, la P678-56 se reporta por Meager y colaboradores (64). La cepa de E. coli RR1 (pro^- , leu^- , $B1^-$, Str^+ , r^- , $LacY^-$, $RecA^+$) fue construida y donada por el dr. R.L. Rodríguez.

Los medios de cultivo fueron reportados por Miller J. (65) y se utiliza generalmente medio Luria a menos que se especifique lo contrario.

1.2) Enzimas.- Las enzimas de restricción BamH1, EcoRI y HpaII se purificaron en el laboratorio del Dr. F. Bolivar. Sau3A y XbaI se adquirieron de BRL; y Hi PL Pharmacia. La ligasa de DNA se purificó en el laboratorio del Dr. F. Bolivar y el fragmento Klenow de la polimerasa I de E. coli se adquirió de Boehringer Mannheim.

2) Manejo de DNA

2.1) Transformación con DNA de plásmido.- Se utilizó el método reportado por Cohen et al (18).

2.2) Purificación de plásmido y microensayo de DNA.- Se utilizaron los métodos reportados en el manual de laboratorio publicado por Maniatis y colaboradores (61).

2.3) Electroforesis en geles de poliacrilamida y agarosa.- Son geles verticales según lo reportado por Bolivar et al. (11).

2.4) Electroelusión de DNA de geles de agarosa o poliacrilamida.- Se corta el fragmento del gel que contenga el DNA que se desee electroeluir y se coloca en la cámara de electroelusión y se cubre con buffer TE (10 mM Tris pH8, 1mM EDTA). Se establece un puente de corriente eléctrica entre dos cámaras utilizando buffer TEA (193.6 g Tris; 65.6 g acetato de sodio anhidro; 29.6 g NaEDTA; se ajusta el pH a 8.1 con ácido acético y se lleva a un volumen final de 4 litros. Para usarse se diluye 1:1. Se mantiene a 80 volts constantes por 3 horas cambiando el buffer TE cada 45 minutos. Antes de cada cambio se invierte la corriente 60 segundos para que el DNA se desprege de las membranas.

2.5) Purificación de DNA con columnas de BND celulosa.- Estas columnas tienen por objeto concentrar y limpiar el DNA en solución, principalmente cuando éste proviene de electroelusión. La resina se adquirió de Serva Inc.. Para usar, se hidrata la resina en buffer de lavado (10mM Tris pH7.5; 10mM NaCl), se monta en la columna y se lava con 5 ml del mismo buffer. Se pasa el DNA en solución por la columna y éste queda pegado a la misma. Se lava la columna con 10 ml de buffer de lavado y para despegar el DNA se pasan de 300 a 500 ul de buffer de elusión (1mM Tris pH8; 1M NaCl; 15% etanol). Se agregan 2 volúmenes de etanol a -20°C para precipitar el DNA y se deja por lo menos 2 horas a -20°C .

2.6) Hibridización en colonia.- Se llevó a cabo fijando el las colonias en papel filtro Whatman 3MM, según el método reportado en el Maniatis (61).

3) Manejo de proteínas.

3.1) Lisis celular por sonicación.- Se utilizó un aparato Soniprep 150. Una vez lavadas las células con 10 mM NaCl y 1mM EDTA, se resuspenden en 600 ul de buffer de sonicado (50mM tris pH7.6 y 10mM de beta-mercapto etanol). La suspensión se somete a pulsos de 10 segundos (para evitar que se desnaturalicen las proteínas por la temperatura) con el aparato a su máxima potencia hasta que la solución se aclare.

3.2) Cuantificación de proteínas.- Se llevó a cabo por el método reportado por Lowry (60) con el reactivo de folin.

3.3) Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.- Se utilizó el método descrito por Laemmli (56).

3.4) Densitometría de geles.- Se utilizaron dos densitómetros. Para el análisis de la biosíntesis de las proteínas híbridas con beta-galactosidasa se utilizó un densitómetro Gilford con las siguientes condiciones: longitud de onda=540 nm; sensibilidad=0.0; Multiplo=1.0; grosor del gel=0.16mm; velocidad de lectura=2 in/min; velocidad de graficado= 1 in/min. En este aparato se analizó el gel fresco.

En todos los demás casos se utilizó un espectrofotómetro computarizado Beckman DU-8 con las siguientes condiciones: longitud de onda= 500; slit w=0.5; supp=0.0; span=2.0; velocidad del graficador= 5 in/min; velocidad de lectura= 5 in/min; grosor del gel= 0.1 mm; sensibilidad= 1. En este aparato se utilizaron negativos de las fotografías de los geles.

3.5) Minicélulas.- Se utilizó el método reportado por Meager (64) con metionina S-35 de Amersham.

3.6) Actividad de transacetilasa de cloranfenicol.- Se utilizó el método reportado por Shaw (74) ajustando los volúmenes de reacción a 1 ml en vez de 10 ml. Las mediciones se hicieron automáticamente en un espectrofotómetro Beckman DU-8, a 37 °C.

REFERENCIAS

- 1) Alton N.K. y D. Vapnek. NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF THE CHLORAMPHENICOL RESISTANCE TRANSPOSON Tn9. Nature. (1979) 282:864-872
- 2) Amann E., Brosius J. y M. Ptashne. VECTORS BEARING A HIBRID trp-lac PROMOTER USEFUL FOR REGULATED EXPRESSION OF CLONED GENES IN E. coli. Gene (1983) 25:167-178
- 3) Baker R.F. y C. Yanofsky. DIRECTION OF in vivo DEGRADATION OF A MESSENGER RNA. Nature (1969) 219:26-29
- 4) Balbás P. PRODUCCION DE PROTEINAS EN BACTERIAS MEDIANTE RECOMBINACION in vitro DE ACIDOS NUCLEICOS. Tesis para obtener el Título de Licenciado en Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad Iberoamericana. México 1981.
- 5) Bassford P., Bekwith J., Berman M., Brickman E., Casabadan M., Guarente L., Saint-Girons I., Sarthy A., Shwartz M., Schuman H. y T. Silhavy. GENETIC FUSIONS OF THE lac OPERON: A NEW APPROACH TO THE STUDY OF BIOLOGICAL PROCESSES. En The Operon. Miller J.H. y W.S.Reznikoff eds. Cold Spring Harbor Lab. USA, 1978.
- 6) Bittner M. y D. Vapnek. VERSATILE CLONING VECTORS DERIVED FROM THE RUNAWAY-REPLICATION PLASMID pKN402. Gene (1981) 15:319-329
- 7) de Boer H.A., Comstock L., Yansura D.G. y H.L. Heyneker. CONSTRUCTION OF A TANDEM trp-lac PROMOTER AND A HYBRID trp-lac PROMOTER FOR EFFICIENT AND CONTROLLED EXPRESSION OF THE HUMAN GROWTH HORMONE GENE IN E. coli. en Promoters, structure y function. Rodriguez R.L. y M.J. Chamberlin. Praeger eds. (1982)
- 8) de Boer H.A., Comstock L. y M. Vasser. THE tac PROMOTER: A FUNCTIONAL HYBRID PROMOTER DERIVED FROM THE trp AND lac PROMOTERS. en prensa.
- 9) de Boer H.A. y H.M. Shepard. STRATEGIES FOR OPTIMIZING FOREIGN GENE EXPRESSION IN E. coli. en prensa.
- 10) Bogosian G. y R. Somerville. trp REPRESSOR PROTEIN IS CAPABLE OF INTRUDING INTO OTHER AMINO ACID BIOSYNTHETIC SYSTEMS. Mol. Gen. Gentet. (1983) 191:51-58

11) Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M. C. y H.W. Boyer. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NEW CLONING VEHICLES. I. AMPICILLIN-RESISTANT DERIVATIVES OF THE PLASMID pMB9. *Gene* (1977) 2:75-93.

12) Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M.C., Heyneker H.L. y H.W. Boyer. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NEW CLONING VEHICLES. II. A MULTIPURPOSE CLONING SYSTEM. *Gene* (1977) 2:95-113

13) Boyen A., Piette J., Cunin R. y N. Glansdorff. ENHANCEMENT OF TRANSLATION EFFICIENCY IN *E. coli* BY MUTATIONS IN A PROXIMAL DOMAIN OF mRNA. *J. Mol. Biol.* (1982) 162: 715-720

14) Casabadian M.J. y S.N. Cohen ANALYSIS OF GENE CONTROL SIGNALS BY DNA FUSION AND CLONING IN *E. coli*. *J. Mol. Biol.* (1980) 138:179-207.

15) Chang A.C.Y., Nunberg J.H., Kaufman R.J., Elrich H.A., Schimke R.T. y S.N. Cohen. PHENOTYPIC EXPRESSION IN *E. coli* OF A DNA SEQUENCE CODING FOR THE MOUSE DEHIDROFOLATE REDUCTASE. *Nature* (1978) 275:617-624

16) Cheng Y.S.E., Kwoh D.Y., Jesse Kwoh T., Soltvedt B.C. y D. Zipser. STABILIZATION OF A DEGRADABLE PROTEIN BY ITS OVEREXPRESSION IN *E. coli*. *Gene* (1981) 14:121-130.

17) Close T.J. y R.L. Rodriguez. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE CHLORAMPHENICOL-RESISTANCE GENE CARTRIDGE: A NEW APPROACH TO THE TRANSCRIPTIONAL MAPPING OF EXTRACHROMOSOMAL ELEMENTS. *Gene* (1982) 20:305-316

18) Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W. y R.B. Halling. CONSTRUCTION OF BIOLOGICALLY FUNCTIONAL BACTERIAL PLASMIDS *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1973) 70:3240-3243.

19) Covarrubias L., Cervantes L., Covarrubias A., Soberon X., Vichido I., Blanco a., Kuperstoch-Portnoy J. y F. Bolivar. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NEW CLONING VEHICLES. V. MOBILIZATION AND CODING PROPERTIES OF pBR322 AND SEVERAL DELETION DERIVATIVES INCLUDING pBR327 AND pBR328. *Gene* (1981) 13:25-35

20) Covarrubias L. y F. Bolivar. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NEW CLONING VEHICLES. VI. PLASMID pBR329, A NEW DERIVATIVE OF pBR328 LACKING THE 482-BASE PAIR INVERTED DUPLICATION. *Gene* (1982) 17:79-89

21) Crawford I.P., y G.V. Stauffer. REGULATION OF TRYPTOPHAN BYOSYNTHESIS. *Ann. Rev. Biochem.* (1980) 49:183-195.

- 22) Crea R., Crazewski A., Hirose T. y K. Itakura. CHEMICAL SYNTHESIS OF GENES FOR HUMAN INSULIN. Proc. Natl. Acad. Sci. (1978) 75:5765-5769
- 23) Derynk R., Remaut E., Saman E., Stanssens P., Declercq E., Content J. y W. Fiers. EXPRESSION OF HUMAN FIBROBLAST INTERFERON GENE IN E. coli. Nature (1980) 287: 193-197.
- 24) Doolittle W. F. y C. Yanofsky. MUTANTS OF E. coli WITH AN ALTERED TRYPTOPHANYL-TRANSFER NUCLEIC ACID SYNTHETASE. J. Bacteriol (1968) 95:1283-1294.
- 25) Edman J.C., Hallewell R.A., Valenzuela P., Goodman H. y W.J. Rutter. SYNTHESIS OF HEPATITIS B SURFACE AND CORE ANTIGENS IN E. coli. Nature (1981) 291:503-506.
- 26) Efstradiatis A., Kafatos F.C., Maxam A.M. y T. Maniatis. ENZYMATIC in vitro SYNTHESIS OF GLOBIN GENES. Cell (1976) 7:279-288
- 27) Enger-Valk B.E., Heyneker H.L., Oosterbaan R.A. y P.H. Powells. CONSTRUCTION OF NEW CLONING VEHICLES WITH GENES OF THE TRYPTOPHAN OPERON OF E. coli AS GENETIC MARKERS. Gene (1980) 9:69-85.
- 28) Ganoza M.C., Fraser A.R. and T. Neilson. NUCLEOTIDES CONTIGUOUS TO AUG AFFECT TRANSLATIONAL INITIATION. Biochem. (1978) 17:2769-2775
- 29) Gentz R., Langner A., Chang A.C.Y. Cohen S. y H. Bujard. CLONING AND ANALYSIS OF STRONG PROMOTERS IS MADE POSSIBLE BY THE DOWNSTREAM PLACEMENT OF A RNA TERMINATOR SIGNAL. Proc. Natl. Acad. Sci. (1981) 78:4936-4940
- 30) Gheysen D., Iserentant D., Derom C. y W. Fiers. SYSTEMATIC ALTERATION OF THE NUCLEOTIDE SEQUENCE PRECEDING THE TRANSLATION INITIATION CODON AND THE EFFECTS ON BACTERIAL EXPRESSION OF THE CLONED SV40 SMALL-T ANTIGEN GENE. Gene (1982) 17:55-63
- 31) Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose T., Krazewski A., Itakura K. y A.D. Riggs. EXPRESSION IN E. coli OF CHEMICALLY SYNTHESIZED GENES FOR HUMAN INSULIN. Proc. Natl. Acad. Sci. (1979) 76:205-209
- 32) Goeddel D.v., Heyneker H.L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D.G., Ross M.J., Miozzari C., Crea R. y P. Seeburg. DIRECT EXPRESSION IN E. coli OF A cDNA SEQUENCE CODING FOR HUMAN GROWTH HORMONE. Nature (1979) 281:544-548

33) Goeddel D.V., Ylverton E., Ullrich A., Heyneker H.L., Miozzari G., Holmer W., Seeburg P.H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Aeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J.M. Gross M., Familletti P.C. y S. Pestrika. HUMAN LEUKOCYTE INTERFERON PRODUCED BY E. coli IS BIOLOGICALLY ACTIVE. Nature (1980) 287: 411-416

34) Goeddel D.V., Leung D.W., Dull T.J., Gross M., Lawn R.M., Maccandliss R., Seeburg P.H., Ullrich A., Ylverton E. y P.W. Gray. THE STRUCTURE OF EIGHT DISTINCT CLONED HUMAN LEUKOCYTE INTERFERON cDNAs. Nature (1981) 290: 20-26

35) Gold L., Pribnow D., Schneider T., Shinedling S., Swebilis B. y G. Stormo. TRANSLATIONAL INITIATION IN PROKARYOTES. Ann. Rev. Microbiol. (1981) 35:365-403

36) Gottesman S. y D. Zipser. Deg PHENOTYPE OF E. coli lon MUTANTS. J. Bact. (1978) 133:844-851

37) Gray P.W., Leung D.w., Pennica D., Ylverton E., Najarian R., Simonsen C.C., Derynk R., Sherwood P.J., Wallace D., Berger S.L., Levinson A.D. y D.V. Goeddel EXPRESSION OF HUMAN IMMUNE INTERFERON cDNA IN E. coli AND MONKEY CELLS. Nature (1982) 295:503-508

38) Grosjean H. y W. Fiers. PREFERENTIAL CODON USAGE IN PROKARYOTIC GENES: THE OPTIMAL CODON-ANTICODONS INTERACTION ENERGY AND THE SELECTIVE CODON USAGE IN EFFICIENTLY EXPRESSED GENES. Gene (1982) 18:199-209

39) Hall N.H., Gabay J., Debarbouille M y M. Schwartz. A ROLE FOR THE mRNA SECONDARY STRUCTURE IN THE CONTROL OF TRANSLATION INITIATION. Nature (1982) 295:616-618

40) Hallewell R.A. y S. Entage. PLASMID VECTORS CONTAINING THE TRYPTOPHAN OPERON PROMOTER SUITABLE FOR EFFICIENT REGULATED EXPRESSION OF FOREIGN GENES. Gene (1980) 9:27-47

41) Harper H.A., Rodwell V.W. y P.A. Mayes. QUIMICA FISIOLÓGICA. 6a ed. El Manual Moderno Eds. Mexico, 1978.

42) Hautala J.A., Bassett C.E., Giles N.H. y S. R. Kushner. INCREASED EXPRESSION OF A EUKARYOTIC GENE IN E. coli THROUGH STABILIZATION OF ITS MESSENGER RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (1979) 76:5774-5778

43) Hawley D.K., Malan T.P., Mulligan M.E. y W.R. McClure. INTERMEDIATES ON THE PATHWAY TO OPEN COMPLEX FORMATION. en Promoters, structure y function. Rodriguez R.L. y M.J. Chamberlin. Praeger eds. (1982).

44) Hawley D.K. y W.R. McClure. COMPILATION AND ANALYSIS OF E. coli PROMOTER DNA SEQUENCES. Nuc. Ac. Res. (1983) 11:2237-2255

- 45) Hitzeman R.A., Hagie F.E., Levine H.L., Goeddel D.V., Ammerer G. y B.D. Hall. EXPRESSION OF A HUMAN GENE FOR INTERFERON IN YEAST. *Nature* (1981) 293: 717-722
- 46) Holmes W.M., Platt T. y M. Rosenberg. TERMINATION OF TRANSCRIPTION IN *E. coli*. *Cell*. (1983) 32:1029-1032
- 47) Horowitz H. y T. Platt. REGULATION OF TRANSCRIPTION FROM TANDEM AND CONVERGENT PROMOTERS. *Nuc. Ac. Res.* (1981) 9
- 48) Ikemura T. CORRELATION BETWEEN THE ABUNDANCE OF *E. coli* TRANSFER RNAs AND THE OCCURRENCE OF THE RESPECTIVE CODONS IN ITS PROTEIN GENES: A PROPOSAL FOR A SYNONIMOUS CODON CHOICE THAT IS OPTIMAL FOR THE *E. coli* TRANSLATIONAL SYSTEM. *J. Mol. Biol* (1981) 151: 389-409
- 49) Iserentant D. y W. Fiers. SECONDARY STRUCTURES OF mRNA AND EFFICIENCY OF TRANSLATION INITIATION. *Gene* (1980) 9:1-12
- 50) Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A., Heyneker H. L., Bolivar F. y H.W. Boyer. EXPRESSION IN *E. coli* OF A CHEMICALLY SYNTHESIZED GENE FOR THE HORMONE SOMATOSTATIN. *Science* (1977) 198:1056-1063
- 51) Kastelein R.A., Berkhout B. P. y J. van Duin. EFFECT OF THE SEQUENCES UPSTREAM FROM THE RIBOSOME BINDING SITE ON THE YIELD OF PROTEIN FROM CLONES GENE FOR PHAGE MS2 COAT PROTEIN. *Gene* (1983) 23:245-254.
- 52) Katsoyannis P. G., Tomestko A., Zalut C., Johnsons A.C. y A.C. Trakatellis. STUDIES ON THE SYNTHESIS OF INSULIN FROM NATURAL AND SYNTHETIC A AND B CHAINS. *Biochem.* (1967) 6:2642-2655
- 53) Kelley R.L. y C. Yanofsky. *trp* APPROPRIATE PRODUCTION IS CONTROLLED BY AUTOGENOUS REGULATION AND INEFFICIENT TRANSLATION. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1982) 79:3120-3124.
- 54) Kleid D. G., Yansura D., Small B., Moore D.M., Grubman M.J., Mckercher P.D., Morgan D.O., Robertson B.H. y H.L. Bachrach. CLONED VIRAL PROTEIN VACCINE FOR FOOT AND MOUTH DISEASE: RESPONSES IN CATTLE AND SWINE. *Science* (1981) 214:1125-1129.
- 55) Kostic A., Vujosevic M., Nikolic S. y N. Keserovic. THE USE OF LEUKOCYTE INTERFERON IN HUMAN DISEASES. en el 1er Seminario Cubano sobre Interferon. La Habana, Cuba. 1983.
- 56) Laemmli U.K. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4. *Nature* (1970) 227:680-685

57) Lamond A.I. y A.A. Travers. REQUIREMENT FOR AN UPSTREAM ELEMENT FOR OPTIMAL TRANSCRIPTION OF A BACTERIAL tRNA GENE. *Nature* (1983) 305:248-250

58) Lawn R.M., Adelman J., Bock S.C., Franke A.E., Houck C.M., Najarian R.C., Seeburg P.H. y K.L. Wion. THE SEQUENCE OF HUMAN SERUM ALBUMIN cDNA AND ITS EXPRESSION IN *E. coli*. *Nuc. Ac. Res.* (1981) 9:6103-6114.

59) Lengyel P. BIOCHEMISTRY OF INTERFERONS AND THEIR ACTIONS. *Ann. Rev. Biochem.* (1982) 51:251-282

60) Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A. y R. Randall. PROTEIN DETERMINATION BY THE FOLIN-FENOL REACTION. *J. Biol. Chem.* (1951) 193:265.

61) Maniatis T., Fritsch E.F. y J. Sambrook. MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Lab. 1982.

62) Martial J.A., Hallewell R.A., Baxter J.D. y H.M. Goodman. HUMAN GROWTH HORMONE: cDNA CLONING AND EXPRESSION IN BACTERIA. *Science* (1979) 205:602-607.

63) Mateucci M. D. y H.L. Heyneker. TARGETED RANDOM MUTAGENESIS: THE USE OF AMBIGUOUSLY SYNTHESIZED OLIGONUCLEOTIDES TO MUTAGENIZE SEQUENCES IMMEDIATELY 5' OF AN ATG INITIATION CODON. *Nuc. Ac. Res.* (1983) 11:3113-3121.

64) Meager R.B., Tait R., Battlach M.C. y H.W. Boyer. PROTEIN EXPRESSION IN *E. coli* MINICELLS BY RECOMBINANT PLASMIDS. *Cell* (1977) 10:521-536

65) Miller J.H. EXPERIMENTS IN MOLECULAR GENETICS. Cold Spring Harbor Lab. USA 1972.

66) Mulligan M. E., Hawley D.K., Entriken R. y W. R. McClure. *Escherichia coli* PROMOTER SEQUENCES PREDICT *in vitro* RNA POLIMERASE SELECTIVITY. *Nuc. Ac. Res.* (1984) 12:784-800

67) Nierman W.C. OVEREXPRESSION OF CLONED GENE PRODUCTS: A REVIEW. *ATCC Quarterly Newsletter.* (1982) 2:2-5.

68) Oliver G. CLONACION DE UN cDNA DE INTERFERON LEUCOCITARIO HUMANO. Tesis para la obtención del grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica. UNAM. (1983).

69) Palva I., Lehtovaara P., Kaariainen L., Sibakov M., Cantell k., Schein C. H., Kashiwagi K. y C. Weissmann. SECRETION OF INTERFERON BY *Bacillus subtilis*. *Gene* (1983) 22:229-235

- 70) Paul D.C., Van Frank R.M., Muth W.L., Ross J.W. y D.C. Williams. IMMUNOCYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF HUMAN PROINSULIN CHIMERIC POLYPEPTIDE WITHIN CYTOPLASMIC INCLUSION BODIES OF *E. coli*. *European Journal of Cell Biology*. (1983) en prensa.
- 71) Platt T. TERMINATION OF TRANSCRIPTION AND ITS REGULATION IN THE *trp* OPERON. *Cell* (1981) 24:10-23
- 72) Reiner A.M. CHARACTERIZATION OF POLINUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE MUTANTS IN *E. coli*. *J. Bact.* (1969) 97:1437-1443
- 73) Remaut E., Stranssens P. y W. Fiers. INDUCIBLE HIGH LEVEL SYNTHESIS OF MATURE HUMAN FIBROBLAST INTERFERON IN *E. coli*. *Nuc Ac. Res.* (1983) 11:4677-4688
- 74) Righetti P. G. y F. Chillemi. ISOELECTRIC FOCUSING OF PEPTIDES. *Chrom.* (1978) 10:985-993.
- 75) Roberts T.M., Kacich R. y M. Ptashne. A GENERAL METHOD FOR MAXIMIZING THE EXPRESSION OF A CLONED GENE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1978) 76:760-764
- 76) Roberts T.M., Bikel I., Yocum R., Livingston D.M. y M. Ptashne. SYNTHESIS OF SIMIAN VIRUS 40 t ANTIGEN IN *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1979) 76:5596-5600
- 77) Roberts T.M. A *lac* PROMOTER SYSTEM FOR THE EXPRESSION OF PROCARYOTIC AND EUKARYOTIC GENES IN *E. coli*. en *Promoters, structure y function*. Rodriguez R.L. y M.J. Chamberlin. Praeger eds. (1982).
- 78) Rose J.K. y C. Yanofsky. INTERACTION OF THE OPERATOR OF THE TRYPTOPHAN OPERON WITH REPRESOR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1974) 71:3134-3138.
- 79) Rosenberg M. y D. Court. REGULATORY SEQUENCES INVOLVED IN THE PROMOTION AND TERMINATION OF RNA TRANSCRIPTION. *Ann. Rev. Genet.* (1979) 13:319-353.
- 80) Rosteck P.R., Jr y C.H. Hershberger. SELECTIVE RETENTION OF RECOMBINANT PLASMIDS CODING FOR HUMAN INSULIN. *Gene* (1983) 25:29-38.
- 81) Russell D.R. y G.N. Bennett. CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF IN VIVO ACTIVITY OF *E. coli* PROMOTER HYBRIDS AND PROMOTER MUTANTS THAT ALTER THE -35 TO -10 SPACING. *Gene* (1982) 20:231-243.
- 82) Sanger F., Nicklen S. y R. Coulson. DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977) 74:5463-5467

83) Schroder J., Hillebrand A., Klipp W. y A. Puhler. EXPRESSION OF PLANT TUMOR-SPECIFIC PROTEINS IN MINICELLS OF *E. coli*: A FUSION PROTEIN OF LYSOPINE DEHYDROGENASE WITH CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE. *Nuc. Ac. Res.* (1981) 9:5187-5202

84) Shaw W.V. CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE FROM CHLORAMPHENICOL-RESISTANT BACTERIA. *Methods in enzymology* 46:737-755

85) Shaw W.V., Packman L.C., Burleigh B.d., Dell A., Morris H.R. y B.S. Hartley. PRIMARY STRUCTURE OF A CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE SPECIFIED BY R PLASMIDS. *Nature* (1979) 282:870-872

86) Shepard H.M., Ylverton E. y D.V. Goeddel. INCREASED SYNTHESIS IN *E. coli* OF FIBROBLAST AND LEUKOCYTE INTERFERONS THROUGH ALTERATIONS IN RIBOSOME BINDING SITES. *DNA* (1982) 1: 125-131.

87) Singer B.S., Gold L., Shinedling S.T., Hunter R. L., Pribnow D. y M.A. Nelson. ANALYSIS in vivo OF TRANSLATIONAL MUTANTS OF THE γ IIB CISTRON OF BACTERIOPHAGE T4. *J. Mol. Biol.* (1981) 149: 405-432.

88) Slocombe P., Easton A., Boseley P. y D.C. Burke. HIGH LEVEL EXPRESSION OF AN INTERFERON ALFA 2 GENE CLONED IN PHAGE M13mp7 AND SUBSEQUENT PURIFICATION WITH MONOCLONAL ANTIBODY. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1982) 79: 5455-5459.

89) Soberon X., Rossi J., Larson G.F. y K. Itakura. A SYNTHETIC, CONSENSUS SEQUENCE PROKARYOTIC PROMOTER IS FUNCTIONAL. en *Promoters. Structure y function.* Rodriguez R.L. y M.J. Chamberlin eds. Praeger, 1982.

90) Stormo G.D., Schneider T.D. y L.M. Gold. CHARACTERIZATION OF TRANSLATIONAL INITIATION IN *E. coli*. *Nuc. Ac Res.* (1982)10:2472-2996.

91) Strander H. TREATMENT OF MALIGNANT DISEASES WITH HUMAN INTERFERON alfa. En el 1er. seminario cubano sobre interferon. La Habana, Cuba. 1983.

92) Struhl K. y R.W. Davis. PRODUCTION OF A FUNCTIONAL EUKARYOTIC ENZYME IN *E. coli*: CLONING AND EXPRESSION OF THE YEAST STRUCTURAL GENE FOR IMIDAZOLE-GLYCEROLPHOSPHATE DEHIDRATASE (His3). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977) 74: 5255-5259

93) Swamy S. y A.L. Goldberg. *E. coli* CONTAINS EIGHT SOLUBLE PROTEOLYTIC ACTIVITIES, ONE BEING ATP DEPENDENT. *Nature* (1981) 292:652-654

94) Tacon W., Carey N. y S. Emtage. THE CONSTRUCTION AND CHARACTERISATION OF PLASMID VECTORS SUITABLE FOR THE EXPRESSION OF ALL DNA PHASES UNDER THE CONTROL OF THE E. coli TRYPTOPHAN PROMOTER. Mol. Gen. Genet. (1980) 177:427-438.

95) Tacon W., Bonass W., Jenkins B. y J.S. Emtage. EXPRESSION PLASMID VECTORS CONTAINING E. coli TRYPTOPHAN PROMOTER TRANSCRIPTIONAL UNITS LACKING THE ATTENUATOR. Gene (1983) 23:255-265.

96) Technology Marketing Group Ltd. INTERFERON FORUM '81. Report no. 132. USA, 1981.

97) Tuite M.F., Dobson M. J., Roberts N.A., King R.M., Burke D.C., Kingsman S.M. y A.J. Kingsman REGULATED HIGH EFFICIENCY EXPRESSION OF HUMAN INTERFERON ALPHA IN *Saccharomyces cerevisiae*. The EMBO Journal (1982) 1: 603-608

98) Uhlin B. E., Molin S., Gustafsson P. y K. Nordstrom. PLASMIDS WITH TEMPERATURE-DEPENDENT COPY NUMBER FOR AMPLIFICATION OF CLONED GENES AND THEIR PRODUCTS. Gene (1979) 6:91-106

99) von Gabain A. y H. Bujard. INTERACTION OF E. coli DNA POLYMERASE WITH PROMOTERS OF SEVERAL COLIPHAGE AND PLASMID DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. (1979) 76:189-193

100) von Gabain A., Belasco J.G., Schottel J.L., Chang A. J. y S. N. Cohen. DECAY OF mRNA IN E. coli: INVESTIGATION OF THE FATE OF SPECIFIC SEGMENTS OF TRANSCRIPTS. Proc. Natl. Acad. Sci. (1983) 80:653-657.

101) von Hippel P.H., Bear D.G., Winter R.B. y O.G. Berg. MOLECULAR ASPECTS OF PROMOTER FUNCTION. A REVIEW. en Promoters, structure y function. Rodriguez R.L. y M.J. Chamberlin. Prager eds. (1982).

102) Wallace R.B., Johnson M.J., Suggs S.V., Miyoshi K., Bhatt R. y K. Itakura. A SET OF SYNTHETIC OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE PRIMERS FOR DNA SEQUENCING IN PLASMID VECTOR pBR322. Gene (1981) 16:21-26

103) Walz A., Ratzkin B. y J. Carbon. CONTROL OF EXPRESSION OF A CLONED YEAST (*Saccharomyces cerevisiae*) GENE (*trp5*) BY A BACTERIAL INSERTION ELEMENT. Proc. Natl. Acad. Sci. (1978) 75:6172-6176.

104) Windass J.D., Newton C.R., De-Meyer Guingard J., Moore V.E., Markham A.F. y M.D. Edge. THE CONSTRUCTION OF A SYNTHETIC E. coli *trp* PROMOTER AND ITS USE IN THE EXPRESSION OF A SYNTHETIC INTERFERON GENE. Nuc. Ac. Res. (1982) 10:6639-6657.

105) Yanofsky c. ATTENUATION IN THE CONTROL OF EXPRESSION OF BACTERIAL OPERONS. Nature (1981) 289:751-758.

106) Yanofsky C., Platt T., Crawford I.P., Nichols B.P., Christie E.P., Horowitz H., Van Cleemput M. y A.M. Wu. THE COMPLETE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE TRYPTOPHAN OPERON OF E. coli. Nuc. Ac. Res. (1981) 9:6647-6668

107) Zurawsky G., Elseviers D., Stauffer G. y C. Yanofsky. TRANSLATIONAL CONTROL OF TRANSCRIPTION TERMINATION AT THE ATTENUATOR OF THE E. coli trp OPERON. Proc. Natl. Acad. Sci. (1978) 75:5988-5992

108) Zurita M., Bolivar F. y X. Soberon. CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NEW CLONING VEHICLES.VII. CONSTRUCTION OF pBR327-PAR, A STABLE DERIVATIVE OF pBR327 CONTAINING THE PAR LOCUS OF pSC101. Gene. (1984) en prensa.

109) Tomado de INTERFERON NOMENCLATURE. Nature (1980) 286:110

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.
UNIDAD ACADÉMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO / CCH
UNAM