

03062

leg. 1

CLONACION DE UN cDNA DE INTERFERON LEUCOCITARIO

HUMANO

Tesis presentada por Guillermo Oliver para la  
obtención del grado de Maestría en Investigación  
Biomédica Básica

**TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN**



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 está 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.

## I N D I C E

	NO. PAG.
<u>INTRODUCCION</u>	
* Generalidades	1
* Interferón leucocitario	9
* Interferón fibroblasto	14
* Interferón inmune	17
* Expresión	20
* Híbridos	23
* Localización cromosomal	24
<u>JUSTIFICACION</u>	25
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
*a) Purificación del RNAm con extensiones de Poli(A) [Poli(A) <sup>+</sup> ]	26
*b) Síntesis del cDNA	26
*c) Clonación molecular	27
*d) Secuencia de DNA	28

RESULTADOS Y DISCUSION

*a) Purificación del RNAm poli(A) <sup>+</sup>	30
*b) Preparación del cDNA	30
*c) Clonación molecular del DNA	36
*d) Caracterización de los fragmentos de cDNA clonados	37
*e) Secuencia de DNA	42
*f) Conclusiones	45

REFERENCIAS

46

## I N T R O D U C C I O N

### GENERALIDADES:

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 y por inhibir la proliferación celular y modular la respuesta inmune (30,45,55).

De acuerdo a la nomenclatura internacional, para denominar a un factor como interferón, éste debe de ser una proteína que ejerza una actividad antiviral a través de procesos metabólicos celulares que involucren síntesis de RNA y de proteína.

Según su especificidad antigénica se los designa como interferón tipo:

- \*  $\alpha$  : los de origen leucocitario
- \*  $\beta$  : los obtenidos de fibroblasto
- \*  $\gamma$  : los obtenidos de linfocitos

También se les puede nombrar como tipo I al que incluye  $\alpha$  y  $\beta$  y como tipo II al que incluye al  $\gamma$  (26,55).

Se define como una unidad de interferón a la cantidad que re

duce en un 50% la infección viral en aproximadamente 1000 células de un cultivo; para determinar el número de moléculas de interferón por célula se toma una actividad específica de  $4 \times 10^8$  U de interferón por  $\text{mg}^{-1}$ .

Los interferones tienen un peso molecular que varía de 17000 a 21000d; los del tipo I son estables a  $\text{pH}=2$ , precipitan con sulfato de amonio, permanecen estables incluso después de calentarlos en SDS 1%, Urea 5M o mercaptoetanol 1%. Estas características los diferencian de los interferones del tipo II, ya que éstos carecen de las mismas (26,45).

Se encuentran en la mayoría de los vertebrados, su concentración celular es normalmente muy baja y sólo se incrementa al ser inducido el sistema. El interferón del tipo I es naturalmente inducido por virus y el del tipo II por mitógenos y estímulos antigénicos (47).

La historia de estas sustancias se inicia en el año de 1956. En ese año Isaacs y Lindenman, estudiando el fenómeno de interferencia viral por el cual, células expuestas a virus se vuelven resistentes a subsecuentes exposiciones al mismo o diferentes virus, encontraron que esta interferencia podía ser transferida con el fluido del cultivo del cual habían sido previamente removidas las células y los virus. Ellos denominaron a las sustancias que originaban ese fenómeno de interferencia como interferón, a las cuales posteriormente identificaron como pro-

teínas (30,45,53,55,56).

Luego de este hallazgo, numerosos grupos en el mundo comenzaron a intentar la purificación de estas proteínas, a los efectos de caracterizarlas y poder conocer su mecanismo de acción. Los primeros reportes exitosos sobre su purificación aparecieron en 1963, cuando el Dr. Kari Cantell, en Helsinki, comienza a purificarlo en cantidades importantes a partir de células sanguíneas humanas (53). Rápidamente, se hizo evidente que la purificación de interferón resultaba problemática ya que se producen pocas moléculas por célula.

Eran necesarios aproximadamente 2 litros de sangre para obtener 1µg. de proteína. Además, las preparaciones contenían un porcentaje elevado de impurezas por lo que no eran convenientes para el uso clínico (2,18).

Los métodos tradicionales de purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento o la cromatografía de afinidad, no resultan muy efectivos con interferón. Los mejores resultados han sido obtenidos al hacer fraccionamiento en condiciones ácidas con Tritón X-100 y posterior filtración en gel en condiciones desnaturizantes (49,55). Recientemente, se han obtenido resultados interesantes al usar cromatografía HPLC o de afinidad con anticuerpos monoclonales (45). En general, uno de los mayores problemas, en estos casos, es que se obtiene al final una mezcla que contiene los diferentes tipos de interferones.

Los estudios que se han efectuado con el interferón purificado por los métodos antes mencionados, así como principalmente con el obtenido desde hace unos dos años mediante Ingeniería Genética (en que se generan cantidades importantes de la proteína aislada y sin impurezas) han permitido que en la actualidad ya se conozca bastante tanto sobre los genes que los codifican, como sobre su mecanismo de acción.

El interferón es capaz de ser inducido por numerosos agentes tales como: virus, bacterias, micoplasmas, RNA doble cadena natural o sintético, agentes químicos. Algunos de estos son inductores en ciertas especies animales pero no en otras (30).

Se ha visto que el interferón se une a sitios superficiales de la membrana plásmica, lo cual sería necesario, pero no suficiente para que estos desarrollen una actividad antiviral (17). El interferón se une aparentemente a sitios celulares específicos, de los cuales se calcula existen unos 500 por célula. Aparentemente el tipo I posee distintos receptores que el tipo II (6).

Entre los diversos efectos que producen los interferones, podemos citar: (30,32,45,47,55,56,65).

- \* ) Interferencia con la replicación viral, afectan la motilidad y proliferación celular, así como la respuesta inmune.
- \* ) Elevan el nivel de varios RNA mensajeros (RNAm) y enzi-

mas, entre ellas, una de las más importantes es la (2-5) (A)<sub>n</sub> sintetasa. Esta enzima a su vez activa a una endorribonucleasa, la RNAasa L, la cual corta RNA de cadena sencilla. Este proceso es reversible.

- \* ) Inducen en forma reversible una proteína cinasa, que es activada por RNA de doble cadena, y que fosforila al factor de iniciación de la síntesis proteica eIF<sub>2</sub>.
- \* ) Alteran la metilación del RNAm viral y decrecen la proporción de acidos grasos no saturados en los fosfolípidos de membrana, cambiando la rigidez de la membrana celular.
- \* ) Aumentan la toxicidad a diversos agentes; por ejemplo, células tratadas con interferón pueden ser destruídas por exposición a niveles de poli rI:poli rC que no son tóxicos en las células sin tratar.
- \* ) Aumentan la actividad fagocítica.

En general se acepta el hecho de que las células pretratadas con interferón bloquean el crecimiento viral a nivel de la expresión genética (57). Pretratando las células con interferón se inhibe en ellas la replicación viral sin alterar la habilidad del virus para absorberse a las células huésped. Este fenómeno ha hecho que se asuma que el interferón no afecta la habilidad del virus para penetrar a la célula (64). La captación de los virus por células animales es un proceso que ocurre en dos pasos:

- a) Absorción del virus a la superficie celular.
- b) Penetración del virus lo cual ocurre a temperaturas fisiológicas.

En algunos virus este segundo paso se da por fusión directa de los virus y membranas celulares. Otros virus se internalizan por endocitosis. Se ha observado que el interferón inhibe el proceso de endocitosis de la célula, siendo este proceso específico de cada especie (64).

El interferón es una proteína de secreción por lo cual se supone que tanto su procesamiento como exportación son similares a los de otras proteínas de secreción. El modelo del péptido señal propuesto por Blobel para proteínas de exportación, supone que la proteína que entra a una membrana posee un péptido señal hidrofóbico que interactúa con un receptor que se ubica en el retículo endoplásmico. El citoesqueleto y en particular los microtúbulos, se han implicado en el movimiento de las proteínas del lumen del retículo endoplásmico y su posterior secreción.

Se ha observado que al menos el interferón del tipo  $\beta$  humano recién sintetizado se encuentra asociado a una fracción de membrana. El RNAm específico de este interferón también está en su mayor proporción unido a membrana, sugiriendo que la traducción de ese mensaje ocurre a nivel de los polisomas unidos a membrana, lo cual va de acuerdo con el comportamiento postulado para las proteínas con péptido señal. El paso posterior sería de un

corde proteolítico y la secreción (39,55).

Hasta hace algún tiempo, entre los conceptos más generalizados sobre el interferón estaba el de considerarlos como una familia de proteínas glicosiladas. Actualmente, se sabe que, con la excepción del gene leucocitario H, ninguno de los 9 ó 10 genes de la familia de interferón leucocitario restantes, poseen sitios potenciales para glicosilación. Los de origen de fibroblasto podrían tener un sitio de glicosilación a nivel de la secuencia Asn-Glu-Thr- (fig. 3) y los de origen linfocitario poseen 2 sitios posibles situados en las posiciones 28 y 100 (Fig. 4) (30,45).

Por lo que respecta a la estructura secundaria del interferón no es mucho lo que se sabe. Posiblemente, el interferón leucocitario A tenga dos puentes disulfuro, uno entre las cisteínas 1 y 98 y otro entre las 29 y 138, siendo éste último aparentemente necesario para su actividad biológica (45). El  $\gamma$  aparentemente no tiene puentes disulfuros, ya que las 2 cisteínas se encuentran en las posiciones 1 y 3 (22,45).

Entre las formas más sencillas y usadas para medir la actividad antiviral del interferón se ubica el ensayo conocido como inhibición del efecto citopático. En general los virus líticos producen lisis de la célula huésped infectada, generándose mucha progenie viral. Dado que el interferón actúa previniendo la lisis celular y la replicación viral, es posible cuantificarlos de

terminando el grado de inhibición de la lisis celular (efecto ci  
topático).

Este ensayo consiste en poner en una placa de microtitula-  
ción diferentes concentraciones de interferón que vayan desde ce  
ro a un máximo en las diferentes celdas. Luego se le agregan cé  
lulas y virus, se incuba durante una noche y se tiñen las celdas  
con violeta cristal. Las celdas en las que no hubo infección se  
identifican por la existencia de una monocapa celular uniforme  
de color azul; la inhibición de la infección se debe a la presen  
cia de interferón. En aquellas en que no había interferón se de  
tecta la lisis celular por el virus, porque las celdas se ven  
claras al no formarse la monocapa celular (45,55).

Las propiedades antivirales y antiproliferativas del interfe  
rón lo suponen como un agente antitumoral poderoso. Han sido nu  
merosos los casos reportados en los últimos años de tratamiento  
a pacientes con cáncer con preparaciones de interferón. La pri  
mera vez que se le usó en pacientes humanos fué en el año de  
1963 en Francia, en un caso de leucemia mieloide aguda.

En general, al tratar a pacientes con interferón purificado  
de los tejidos originales se han observado efectos colaterales  
que en general han sido dañinos para los pacientes. Esto se in  
terpreta como que las preparaciones llevaban numerosos contami-  
nantes de muy difícil eliminación durante el proceso de purifica  
ción del interferón, además que contenía una mezcla de varios in  
terferones (7,53). En los últimos años, métodos de purifica-

ción más refinados y básicamente la clonación de los diferentes genes de interferón y su producción en bacterias, ha hecho posible obtener cantidades importantes de la proteína sin contaminantes y en particular ha permitido trabajar con preparaciones puras de cada tipo de interferón, por lo que ha aumentado el número de casos en los cuales se ha aplicado el interferón en pacientes con diferentes tipos de cáncer. En general los resultados han sido alentadores (23). El 15 de enero de 1981 el gene de interferón leucocitario A, obtenido por Ingeniería Genética en los laboratorios de Hoffman-La Roche (USA) fué el primero de los obtenidos por esta metodología que fué aplicado en un paciente con resultados muy satisfactorios (45,46).

INTERFERON LEUCOCITARIO: El primero de los genes de interferón clonado fué uno de los del tipo leucocitario (20). La denominación dada a los genes de esta familia varía de acuerdo con el grupo que los ha reportado. Se los conoce bajo el nombre de tipos  $\alpha$  (numerándolos de 1 en adelante) o se les nombra desde la A a la H. (18,20).

El primer gene codificador de interferón que fué clonado en bacterias fué el gene A o  $\alpha_2$  (Fig. 1), que codifica para una proteína con un peso molecular de 19390d. Inmediatamente se supo que existían al menos 10 diferentes genes de origen leucocitario. En la población leucocitaria normal, el RNAm correspondiente al interferón tipo A es el predominante (42%), el correspon-

diente al D representa el 27% y el resto (F,G,B,C,E,H) se encuentran en un porcentaje que va del 3 al 6% (Fig. 2) (20).

El análisis de la secuencia nucleotídica de estos genes ha aportado muchos datos. Así se sabe que todos con excepción del interferón E poseen un péptido líder de 23 aminoácidos, anterior a la proteína madura. Todos ellos con excepción del A, consisten en una proteína madura de 166 aminoácidos, el A tiene 165 faltándole el aminoácido de la posición 44. El gene E parece ser la copia de un pseudogene, ya que posee señales de terminación de la traducción en las 3 posibles fases de lectura. Si esto fuera cierto sería la primer evidencia de un pseudogene que es transcrito a RNA (18,20,26,31,40,41,68).

Al analizar el péptido líder se observa que con excepción del gene E, en todos los otros sus características son muy similares a las de otros péptidos líderes de proteínas eucariontes de secreción; esto es teniendo un largo tramo de residuos hidrofóbicos, flanqueado por aminoácidos cargados y más polares y con una riqueza en serina en el sitio próximo al de su procesamiento. El sitio de corte entre el líder y la proteína madura se encuentra entre los aminoácidos glicina y cisteína (Fig. 1) (9,20,41).

Si se comparan las secuencias de 8 genes leucocitarios para tratar de establecer posibles homologías entre ellos, se encuentra que a nivel del péptido líder existe un 70% de homología,

5' 51 S10  
 TGAGCCTAAACCTTAGGCTCACCCATTTCAACCAGTCTGACAGCATCTGCCAACATCTACA ATG GCC TTG ACC TTT GCT TTA CTG GTG GCC  
50

leu leu val leu ser cys lys ser ser S20' S23 1 10  
 CTC CTG GTG CTC AGC TGC AAG TCA AGC TGC TCT GTG GGC TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAG AGC CTG GGT AGC AGG  
100 20 30 130

ARC THR LEU MET LEU LEU ALA GLN MET ARG LYS ILE SER LEU PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLY  
 AGG 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

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 CAT GAG ATG ATC CAG CAG  
250 50 60 300

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 TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA  
350 70 80

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  
400 100 110 450

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  
500 120 130

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  
550 140 150 160 600

SER LYS GLU  
 AGT AAG GAA TGA AAACIGGTTCAACATGGAAATGATTTTCATTAATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGT  
650 165 170

TTCGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTTCAAATGTTTTAGGAGTATTAATCAACATGTATTGAGCTCTTAAGGCACTAGTCCCTTACAGAG  
750 180 180

GACCATGCTGACTGAICCATTAATCTATTTAAATATTTTTAAATATTATTTTAACTATTTATAAAACAACCTTATTTTTGTTTCATATTACGTCATGTG  
850 190 190

CACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAAATATGTTCTTTGATTTGGTAA  
950

3'

Fig. 1 Secuencia del gene de interferón leucocitario A  
 Los aminoácidos comprendidos entre S<sub>1</sub> y S<sub>23</sub>  
 forman el péptido líder.  
 Subrayados se indican los sitios para la  
 endonucleasa BglII

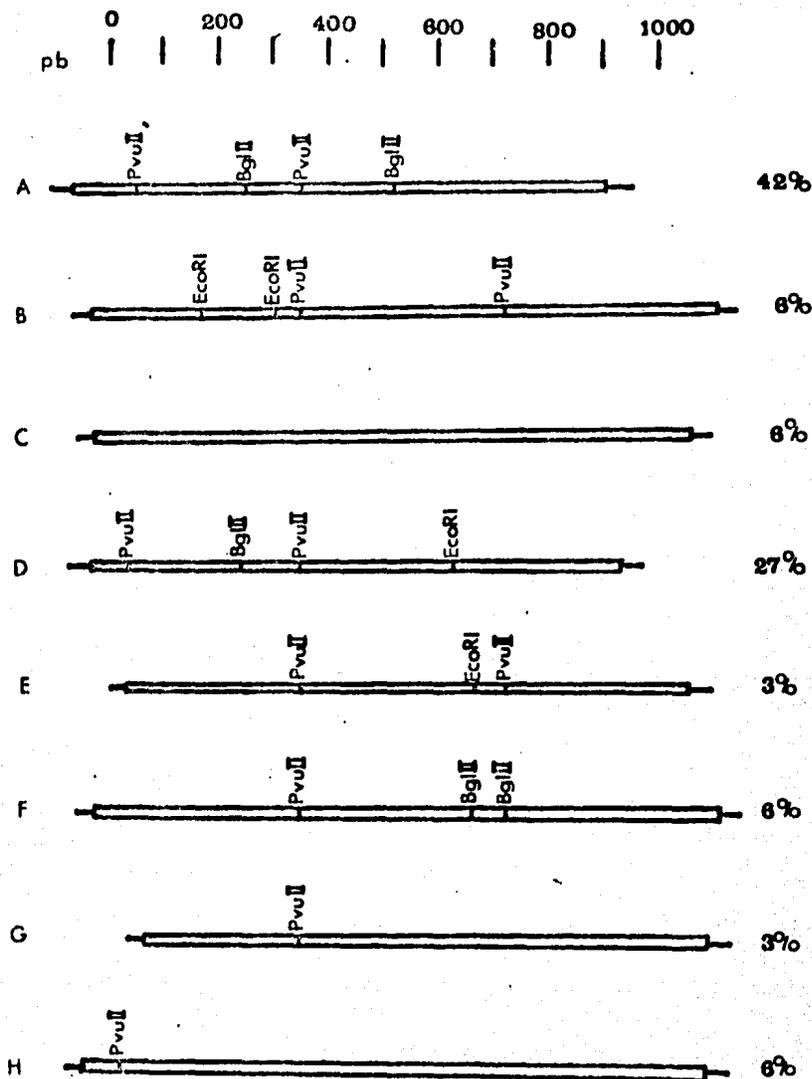


Fig. 2 Mapas de restricción de los diferentes genes de interferón leucocitario  
A la derecha se indica el porcentaje en que se encuentra cada gene en la población celular.

con 11 de 23 aminoácidos en posiciones idénticas. Las homología en la región del péptido maduro son de un 80%, con 79 de 166 aminoácidos idénticos en todos ellos (48%). Si se ignora al gene E al hacer estas comparaciones, entonces el porcentaje de aminoácidos en igual posición pasa a ser de 60%, (99 aminoácidos)(20,45). Si comparamos la región 3' no codificadora que flanquea a estos genes vemos que su longitud varía desde 242 pares de bases (pb) en el gene D, a 441 pb en el gene B; estas variaciones se podrían deber a deleciones evolutivas.

En eucariontes la secuencia consenso que sirve como señal de poliadenilación del RNAm es AATAAA o AATTAAA y se localiza 15 a 25 nucleótidos antes del sitio de adición de poli(A) al RNAm. En los genes A,D,F y G existe la secuencia AATAAA, en cambio en los otros genes la secuencia consenso no se localiza hasta una región bastante posterior con referencia a los genes anteriores y la secuencia que aparece es AATTAAA seguida luego de poli(A). Aparentemente la región 3' se extiende hasta el sitio en que aparece alguna de las dos posibles secuencias señales para poliadenilación (5,9,20,41).

La generación de una serie de plásmidos recombinantes portadores de diferentes cDNAs de interferón leucocitario permitió usarlos como probadores en la identificación directa de ellos en un banco genómico humano (41). Esto, junto a otro tipo de análisis, permitió verificar de que estos genes no poseen intrones

(28,30,41,45). Esta característica resultó de alguna manera sorprendente, dado que todos los genes eucariontes analizados a la fecha con excepción de los genes de las histonas y el genoma de mitocondria humana poseen intrones. La posible implicación funcional y/o evolutiva de este fenómeno aún no se conoce.

La realización del mapeo del RNAm con la nucleasa S1, ha permitido ubicar con precisión el sitio de inicio de la transcripción. Este sitio aparece en la posición -67 de la secuencia nucleotídica y corresponde a los nucleótidos AG, cuando en la mayoría de los eucariontes es AC.

Si se analiza la región 5' de estos genes se encuentra 28 nucleótidos hacia arriba del posible sitio de cap del RNAm la secuencia 5'TATTTAA3' (secuencia de Hogness-Golberg), que en eucariontes se postula de que es importante para el reconocimiento de la RNA polimerasa II. A ambos lados de esta secuencia hay regiones ricas en GC (28,41).

INTERFERON DE FIBROBLASTO: Las técnicas aplicadas para la creación de plásmidos portadores de este gene han sido bastante similares a las usadas con los genes de origen leucocitario (11, 19). Se ha determinado que existe un único gene con este origen que se denomina  $\beta_1$ , aunque se ha reportado otro denominado  $\beta_2$  que probablemente es una duplicación del primero, ya que solamente difieren en un nucleótido.

De igual manera que los leucocitarios éste gene tampoco posee intrones. Codifica también para un péptido líder de 21 aminoácidos y una proteína madura de 166 (fig. 3) (12,19,25,29,45, 59).

En la hebra de DNA con igual polaridad al RNAm hay una abundancia relativa de purinas, que van desde el sitio de inicio de la transcripción hasta la posición -150. En la posición nucleotídica -100 se localiza la secuencia de Hogness-Goldberg (TATAAATA), y en la región de -70 a -80 se encuentra la secuencia que sería reconocida por la RNA polimerasa II, que en los genes leucocitarios aparece en la posición -93 a -85 (Fig. 3)(10).

El mapeo con la nucleasa S1 ha ubicado el sitio de inicio de la transcripción en el nucleótido -73 o -75 (Fig. 3) (42).

Al comparar los genes del tipo  $\alpha$  con los del tipo  $\beta$  se puede observar que a nivel del péptido maduro poseen 39 de 166 aminoácidos (23%) en la misma posición. La diferencia en la distribución de los aminoácidos parece ser al azar, con excepción de la región comprendida entre los aminoácidos 115 al 151 (excluyendo al gene E) en donde los genes  $\alpha$  codifican para los mismos aminoácidos en 31 de 37 posibles. Al comparar esta región entre  $\alpha$  y  $\beta_1$ , se observa que entre las posiciones de los aminoácidos 116 a 150 comparten 17 de 35 aminoácidos posibles, sugiriendo esto que esa región cumpla alguna función importante. En la región 3' no codificadora no se observan homologías importantes entre  $\beta_1$  y  $\alpha_1$  (D). En la región 5', de la posición -1 a -195, las ho-

GAATTCACGGTCGTTTGCCTTTCCTTTCTCCCAAGCTCTGTGTTACAATTTG  
-350

CTTTAGTCATTCACTGAAACTTTAAAAAACATTAGAAAACCTCACAGTTTGTAAATCTTTTTCCCTATTATATATATCATAGATAGGACCTAAATAAA  
-100 -250

CAGTTTACAAACTACTAAAATGTAATGACATAGGAAAACCTGAAAGGGAGAAGTGAAGTGGGAAATTCCTCGAATAGAGAGAGACCATCTCATATA  
-200 -150

ATAGGCCATACCCACGGAGAAAAGGCATTTCTAACTGCAACCTTTCCAGCCCTTTGCTCTGGCACAACAGGTAGTAGGGCGCACTGTTCTGTTGTCAA  
-100 -50

Met thr ser lys cys leu leu gln ile ala leu leu leu cys phe ser thr thr ala leu ser MET SER TYR ASN  
ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC ACT ACA GCT CTT TCC ATG AGC TAC AAC  
+1 30

LEU LEU GLY PHE LEU GLN ARG SER SER ASN PHE GLN CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN GLY ARG LEU GLU  
TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG CTT GAA  
100 150

TYR CYS LEU LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLU ILE LYS GLN LEU GLN GLN PHE GLN LYS GLU ASP  
TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC  
200

ALA ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER SER THR GLY TRP  
GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG  
250 300

ASN GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU PHE ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN HIS LEU LYS THR VAL LEU GLU GLU  
AAT GAG ACT ATT GTT CAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG GAA GAA  
350

LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR TYR GLY ARG ILE  
AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT  
400 450

LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR ILE VAL ARG VAL GLU ILE LEU ARG ASN PHE  
CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC ACT CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT  
500

TYR PHE ILE ASN ARG LEU THR GLY TYR LEU ARG ASN  
TAC TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGA AGATCTCTAGCCCTGTGCCCTCTGGGACTGGACAATTGCTTCAAGCATT  
550 600

CTTCAACCAGCAGATGCTGTTTAAAGTACTGATGGCTAATGACTGCATATGAAAGGACACTAGAAGATTTTGAATTTTTTATAAATTATGAGTTATT  
650 700

TTATTTATTTAAATTTTATTTTGGAAAATAAATTTATTTTGGTGCAAAAGTCAACATGGCAGTTTTAATTTTCGATTTGATTTATATAACCATCCATATTA  
750 800

TAAAATGCCAACGACTACCTATTAGTTCTTCTTTTAAAAATATACCTGCAAAAGTATATACTTTCTGGCCCTCGCCTTTAAGGAATTTAAAATCAAGAAG  
850 900

CCATCATGGATATATAAGGTAAGGACAAATAAGGGGACCTGAACCTTATGGGGGAATAAATATGGCATGAACCTGCTGGGATTAAGAGAGAAAGGAA  
950 1000

AGTGGAGGGTCTGGAACTAAACCTGGGGTCCCATCTCTCTACTGTGTGTCCAGATCTCTCATCAAAAAGTTAGAATTGACCTGGCCATCAGGAAT  
1050 1100

AGCCAGGAAATATGTCAGCTTTTCTGTTCTCCCTAACCTTCCCCAGTTATTTGGGGGATCACTTTCTCTCCGCAAGATTTTTAAATAAATTATGTGCC  
1150 1200

CCCACCATCCCTGCAAGCTTAACGGTGAGAAGTCCCATTTACTTCCATGACACTATTAAGCAGCAATCTTTATTCTGCTCATCTGGACAGCCAAGA  
1250 1300

TGTGTGGTATCTTAGGGGAGCTGTGGGTCCCTGCTCTGGCATGGCACAGGCATCAGGAGAAGAAGCTTTTATACCCCTAGCCATCTGGTGTAGTT  
1350 1400

TTCTCCCTAGTTTTTCAAAAACAAAGCCTGCTTCCAGTCCCACTGCTTGTTCATACAGAATTC  
1450

Fig. 3 Secuencia del gene  $\beta_1$  de interferón de fibroblasto  
Las flechas en las posiciones -73 a -75 indican el sitio de comienzo de la transcripción.  
Las flechas de las posiciones 764 y 766 muestran el sitio de agregado de poli(A) aparecen subrayadas las secuencias de Hogness-Goldberg y la señal de poliadenilación.

mologías son mayores incluyendo los dos sitios probables de interacción de la RNA polimerasa II (9,10,42,45,58).

INTERFERON INMUNE: En este caso para purificar el RNAm con el cual construir luego el cDNA, fue necesario inducir su expresión con antígenos específicos o mitógenos de células T (36).

El interferón de tipo  $\gamma$  posee diferentes propiedades físicas y determinantes antigénicos que los del tipo I (15,45,56), a pesar de que induce las mismas enzimas y posee también actividades antivirales, antitumorales e inmunorregulatorias. Su efecto antiproliferativo en células transformadas es de 10 a 100 veces mayor que el del tipo I (22).

Su peso molecular es de 17100d (15). Consta de un péptido líder de 20 aminoácidos muy hidrofóbicos y un péptido maduro de 146. El sitio de procesamiento del péptido líder es igual que para los tipos  $\alpha$  y queda comprendido entre los aminoácidos glicina y cisteína (Fig. 4).

Una característica importante del gene de interferón  $\gamma$  y que lo diferencia de los otros dos es la existencia de tres intrones. Los tres comienzan con el par de bases GT y terminan con AG; estas bases son las postuladas en el reconocimiento para el procesamiento del RNAm. El primer intrón es de 1238 pb, el segundo de 95pb y el tercero de 2422pb. Por su parte los cuatro exones que dan origen a la proteína madura codifican para 38,23,

AC TTC TTT GGC TTA ATT CTC TCG GAA ACG ATG <sup>51</sup> Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu Gly Ser Leu Gly <sup>520</sup>  
 TTT TTT GCT TTT CAG CTC TGC ATC GTT TTG GGT TCT CTT GGC

Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Trp Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr <sup>30</sup>  
 TAC TGC CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT

Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe <sup>60</sup>  
 CTT TTC TTA GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys <sup>90</sup>  
 AAA AAC TTT AAA GAT GAC CAG AGC ATC CAA AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC AAG TTT TTC AAT AGC AAC AAA AAG

Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met <sup>120</sup>  
 AAA CGA GAT GAC TTC GAA AAG CTG ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT GAA CTC ATC CAA GTG ATG

Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln <sup>146</sup>  
 GCT GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA ACA GGG AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CGA GGT CGA AGA GCA TCC CAG TAA TGG TTG TCC

TGC CTG CAA TAT TTG AAT TTT AAA TCT AAA TCT ATT TAT TAA TAT TTA ACA TTA TTT ATA TGG GCA ATA TAT TTT TAG ACT CAT CAA TCA <sup>600</sup>  
 AAT AAG TAT TTA TAA TAG CAA CTT TTG TGT AAT GAA AAT GAA TAT CTA TTA ATA TAT GTA TTA TTT ATA ATT CCT ATA TCC TGT GAC TGT

CTC ACT TAA TCC TTT GTT TTC TGA CTA ATT AGG CAA GGC TAT GTG ATT ACA AGG CTT TAT CTC AGG GGC CAA CTA GGC AGC CAA CCT AAG <sup>700</sup>  
 CAA GAT CCC ATG GGT TGT GTG TTT ATT TCA CTT GAT GAT ACA ATG AAC ACT TAT AAG TGA AGT GAT ACT ATC CAG TTA CTG CCG GTT TGA

AAA TAT GCC TGC AAT CTG AGC CAG TGC TTT AAT GCC ATG TCA GAC AGA ACT TGA ATG TGT CAG GTG ACC CTG ATG AAA ACA TAG CAT CTC <sup>900</sup>  
 AGG AGA TTT CAT GCC TGG TGC TTC CAA ATA TTG TTG ACA ACT GTG ACT GTA CCC AAA TGG AAA GTA ACT CAT TTG TTA AAA TTA TCA ATA

TCT AAT ATA TAT GAA TAA AGT G <sup>1072</sup>

Fig. 4 Secuencia del cDNA de interferón inmune.

Se indican en las casillas los sitios posibles de glicosilación.

Aparece subrayada la señal de poliadenilación.

61 y 44 aminoácidos (9,21,44).

Existe un solo gene del tipo  $\gamma$  y posee muy poca homología con  $\alpha$  y  $\beta$ . Si al comparar los tres tipos de familias de genes excluimos las posiciones de los aminoácidos 11 al 14 del gene  $\gamma$  y comparamos entonces las posiciones que van desde el aminoácido 7 al 17 en el  $\gamma$  y las 130 a 136 en el  $\alpha$ , entonces encontramos que 6 de 7 aminoácidos son idénticos entre ambos o sea 17 de 21 nucleótidos de homología. Esta homología en esa región es aparentemente significativa, ya que la secuencia de todos los genes  $\alpha$  en ese sitio es muy conservada. La inserción en el gene  $\gamma$  de cuatro aminoácidos en esa región, aumenta la longitud de cadena, pero permaneces las regiones hidrofóbicas a un lado y las hidrofílicas al otro.

Una característica común a todos los interferones es un segmento de 15 residuos con una alta potencialidad para formas  $\alpha$  hélice anfipática, seguida por una región de alta homología en la secuencia.

La secuencia específica de aminoácidos de una región larga de este segmento con una alta potencialidad para formar una estructura anfipática parece ser de poca consecuencia en tanto que su carácter anfipático es conservado, sugiriendo que esta región podría tener un rol estructural estabilizando la superficie de esta proteína. Se ha sugerido que esa región es helicoidal y tiene un papel estructural en los interferones  $\alpha$  y  $\beta$ .

Si alineamos a los tres tipos de interferón a nivel de esas regiones es posible localizar secuencias homólogas entre los residuos 64 a 110 en el gene  $\alpha$ A, 66 a 112 en el  $\beta$  y 59 a 104 en el  $\gamma$  (9).

La secuencia de Hogness-Goldberg se localiza 30pb hacia arriba del inicio del RNAm. El hecho de que la región 5' que precede a los tipos  $\alpha$  y  $\beta$  sea muy homóloga entre ambos, pero no con la del tipo  $\gamma$ , hace suponer que esa región puede estar involucrada en la regulación de la transcripción del gene de acuerdo con el hecho de que existen diferencias en el modo de acción entre los tipos I y II (6,9,15,21).

EXPRESION: Han sido empleados muchos sistemas diferentes para la expresión de los genes clonados de interferón. Estos sistemas buscan una producción elevada de la proteína.

Se les han insertado a los plásmidos portadores de las secuencias para el interferón diferentes promotores que permiten regular e incrementar su expresión. Entre los promotores más empleados figura el promotor de triptofano (promotor y sitio de unión a ribosomas), con el cual se han obtenido algunos de los mejores resultados, que son de aproximadamente unos 600 ug. por litro de cultivo (18). Otros promotores que se han usado son el llamado  $P_L$  del fago  $\lambda$  en el cual la expresión se regula por un represor termosensible (12); también se ha fusionado el gene

de interferón al gene lacZ, insertándolo en el fago M13mp7 (54). En términos generales, el sistema más eficiente ha resultado ser el de triptofano con una producción promedio de  $8 \times 10^7$  U de interferón por litro de cultivo (19,22,47).

En todos los casos, el interferón obtenido mediante la tecnología del DNA recombinante resulta tener las mismas características biológicas que el natural (18,19,22,47).

Resultados interesantes han sido descritos al variar las distancias entre el codón ATG de inicio de la traducción y el sitio de unión a ribosomas (Shine-Dalgarno-SD) en los plásmidos que llevan la información para los genes de interferón tipos  $\alpha$  y  $\beta$ , en que se encuentra regulada su expresión por el promotor de triptofano (52).

La iniciación de la traducción del RNAm en E. coli es un proceso que involucra el apareamiento entre 3 especies de RNA (RNAr 16s, RNAm y fmet tRNA), 3 factores de iniciación (IF1, IF2 y IF3) y la proteína ribosomal S<sub>1</sub> (43).

La estructura secundaria del RNAm es también importante en la regulación de la frecuencia de la iniciación. La secuencia de Shine-Dalgarno comprende de 3 a 12 nucleótidos complementarios de la región 3' del RNAr 16s. El híbrido RNAr 16s- RNAm en el inicio de la traducción y su estabilidad son importantes en la frecuencia de iniciación. La distancia entre el codon AUG y el SD son también de importancia.

Variando la distancia desde el SD (secuencia GGT) al ATG se observó que 9pb era la distancia óptima para la mayor expresión de interferón. Las diferencias que se apreciaban al variar estas distancias se podrían deber a la formación de estructuras secundarias del tipo de tallo y asa. A las distancias de 6,8,9 y 10, el tallo incluye varias secuencias del espaciador, así como al codón AUG y la A que le sigue. En las otras distancias es posible agregar un par G:C al tallo lo cual aumentaría su estabilidad, limitando la accesibilidad de los ribosomas al AUG (52).

También se ha construido el gene D leucocitario en forma sintética, usando en este caso codones preferenciales para E. coli (13).

Otro de los sistemas que se ha empleado para la expresión del interferón ha sido el de levadura. En levadura las señales de iniciación y terminación de la transcripción son muy específicas y no es capaz de procesar genes eucariontes 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 y que haya una adenina en la posición -3 y una pirimidina, que en general es una timina, en la posición +6.

Para maximizar la expresión en este sistema se fusionó el gene D leucocitario con unos pocos codones del gene de fosfoglicerato quinasa de levadura (se regula con glucosa como fuente

de carbono a nivel transcripcional). Se logran obtener  $1 \times 10^6$  moléculas por célula (24,61).

HIBRIDOS: La clonación de los tres tipos de interferón ha permitido mediante manipulaciones genéticas la construcción de genes híbridos de ellos. Aunque este proceso es aún incipiente, se le asigna gran trascendencia, ya que permite generar nuevas proteínas con posible acción biológica más potente y de mayor espectro que las originales. Hasta la fecha ha sido reportada la construcción de 4 tipos de proteínas híbridas (63). Estas se han generado al combinar los genes leucocitarios tipo A y D. Estas proteínas híbridas varían de las originales en 13 o 16 aminoácidos. Los cortes y posteriores uniones de los genes, que se realizaron para la fusión, se efectuaron a nivel de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción Bgl II y Pvu II que se encuentran dentro de la región que codifica para el péptido maduro.

Los estudios que se han realizado con ellos han demostrado que algunos interferones híbridos son aún más activos que los originales, en particular el híbrido denominado como AD. Además manifestaron también diferentes efectos antivirales. El interferón AD resultó ser activo en células de ratón, lo que no ocurre con las proteínas parentales.

Se ha sugerido entonces, que la actividad antiviral se en-

contraría dada por determinantes que se ubican en la región amino de los genes de tipo  $\alpha$ , la región carboxilo del gene D sería la responsable de la acción del híbrido en células de ratón (16, 45).

LOCALIZACION CROMOSOMICA: El uso de híbridos somáticos humano-ratón ha permitido localizar a los genes tipo I en el brazo corto del cromosoma humano No. 9 (44) y los del tipo II en el 12 (60). Los genes que codifican para los receptores de interferón parecen encontrarse en el cromosoma No. 21. Se sabe de que los genes del tipo  $\alpha$  se encuentran bastante ligados y al menos seis de ellos están en una región continua del genoma de 36 kilobases (30).

## JUSTIFICACION

El proyecto de clonar en una primera etapa alguno de los genes de interferón se debe por una parte a las muy alentadoras perspectivas que ofrecen estas proteínas a nivel de terapias antivirales y antitumorales, en particular en el tratamiento de varias enfermedades cuyo tratamiento por los métodos tradicionales no resulta muy eficiente.

Por otro lado, el disponer de estos genes, permite seguir ampliando nuestras perspectivas en la tecnología del DNA recombinante, pudiendo seguir generando lentamente una cierta independencia tecnológica.

El continuar incorporando nuevas técnicas de uso relevante en el campo de la Ingeniería Genética, nos permite generar nuevos y más ambiciosos proyectos de investigación.

Finalmente, el clonar alguno de estos genes, nos facilitará la obtención posterior de otros a partir de un banco genómico humano, usando el o los genes clonados como probadores.

## MATERIALES Y METODOS

### a) PURIFICACION DEL RNAm CON EXTENSIONES DE POLI(A) [POLI(A)<sup>+</sup>] :

El RNAm del interferón leucocitario fué obtenido de un mieloblastoma humano amablemente donado por el Dr. Ricardo Brentani (San Pablo, Brasil).

El RNA celular total se extrajo mediante el método del cloruro de guanidinio, (33,38) separándose el RNAm Poli(A)<sup>+</sup> por cromatografía de afinidad usando como resina oligo d(T) celulosa (1). Esta resina se preparó tratándola primero con NaOH 0.1M y luego se lavó con varios volúmenes de NaCl 0.5M, Tris 0.01M pH=7.5 y EDTA 1mM.

A la preparación del RNA, se le agregó 1/10 de volúmen de EDTA 20mM pH=7.5 y se calentó por 10 min. a 65°C enfriando luego a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregó 1 volúmen de Tris 20mM pH=7.5 y KCl 1M y se aplicó la muestra a la columna. El Poli(A)<sup>+</sup> se eluyó con Tris 10mM pH=7.5 (1,18,33,38).

b) SINTESIS DEL cDNA: La reacción para la construcción del cDNA consistió en lo siguiente:

A 3 $\mu$ g Poli(A)<sup>+</sup> se agregan:

40 U transcriptasa reversa (donada por el Dr. Beard, N.I.H.,

Bethesda, Maryland, U.S.A.)

3 ug primero,

50 uCi dATP ( $\alpha$   $^{32}$  P) (550 Ci/mmol) (Amersham) y

500uM dGTP, dCTP, dTTP, dATP (PL Biochemical USA)

La reacción se realizó en un volumen de 50ul en buffer con KC150mM, Tris 50mM pH=8.3, MgCl<sub>2</sub> 10mM y 30mM 2 mercaptoetanol. Se incubó a 42°C por 45 min. Se separó la marca no incorporada mediante filtración en gel en columna de 10ml de Sephadex G-75. Al cDNA cadena sencilla obtenido se lo trató con NaOH 0.1M por 20 min. a 70°C con objeto de hidrolizar al RNAm, finalmente, se neutralizó con HCl 1M (18,33,38,40).

La segunda cadena del cDNA se construyó en forma similar a la primera, con excepción de que se usaron 4U de transcriptasa reversa y no se usó primero.

Se cuantificó la cantidad de cDNA generado en base a las actividades específicas obtenidas y asumiendo una distribución equimolar de las bases en el RNAm.

Se trató al cDNA doble cadena con 20U de nucleasa S1 (Bethesda Research Laboratories Inc. USA) por 30 min. a 37°C y 5 min. a 3°C (33,38). Posteriormente, se reparó con 1U de DNA polimerasa I (fragmento Klenow) (Boehringer Mannheim) y 10mM de los cuatro dNTPs (33,38).

c) CLONACION MOLECULAR: La adición de homopolímeros de deoxiC al cDNA se realizó de la siguiente manera: A 24ng de cDNA do-

ble cadena se agregan 1.5U de transferasa terminal (Miles Corp. USA) y deoxiCTP (100 $\mu$ M).

Se incubó por 10 min. a 37 $^{\circ}$ c en cacodilato de potasio 100mM pH=7, DTT 0.1mM, CoCl<sub>2</sub> 1mM (18,33,38).

Se unieron luego los 24ng del cDNA con colas de deoxiC con 500 ng de pBR322 linearizado y con colas de deoxiG en el sitio de PstI (New England, Nuclear USA) .

Se transformó con este DNA la cepa de E. coli K12 RRI recA<sup>-</sup> (8).

Se seleccionó para transformantes resistentes a Tetraciclina. Los plásmidos de las colonias transformantes Tc<sup>r</sup> (Ap<sup>S</sup>) se purificaron de acuerdo al método de lisado claro (3).

d) SECUENCIA DE DNA; Se electroeluyeron las bandas EcoRI-Bgl II, Bgl II-Bgl II y Bgl II-PstI del plásmido pBR500 y se ligaron respectivamente 100ng de cada una a 20ng de los fagos M13mp8, M13mp7 y M13mp9 (BRL Inc. USA digeridos con EcoRI-BamHI y BamHI-BamHI y BamHI-PstI (37).

El fago M13 es un fago filamentosos de 7230pb que es excretado de la célula huésped en forma de cadena sencilla. Posee en su genoma una porción del operon lac que incluye una región reguladora y la información para los primeros 146 aminoácidos del gen estructural de la  $\beta$  galactosidasa. Este fragmento complementa la delección del segmento de  $\beta$  galactosidasa que posee el epi-

soma de la célula huésped. Se le ha insertado un fragmento de DNA con sitios únicos de clonación en la porción aminoterminal de la  $\beta$  galactosidasa.

El fenotipo  $\text{lac}^+$  se identifica mediante un sustrato cromogénico (Xgal) e IPTG (inductor) que generan placas azules.

Se transformó la cepa de E. coli K12 JM101 en presencia de 0.01ml de IPTG 100mM y 0.05 ml de XGal 2%. Las colonias blancas transformantes se usaron para la purificación del DNA cadena sencilla que se usó como templado en la reacción de secuencia (37). La secuencia se realizó de acuerdo al método reportado por Sanger et al. (50).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El porcentaje de RNA mensajeros poco abundantes en células eucariontes se estima entre 0.1 a 0.3% del RNAm total.

Para el caso de los RNAm de interferón, estos porcentajes son aún inferiores, por lo cual para purificarlos es necesario inducir su expresión o trabajar con líneas celulares tumorales en que los niveles de interferón sean altos de forma que los rendimientos en la purificación se incrementen. Estos motivos nos condujeron a usar como fuente de RNAm de interferón leucocitario un mieloblastoma humano (18,55).

a) PURIFICACION DEL RNAm POLI (A)<sup>+</sup>: Se partió de 700mg de tejido de donde fueron extraídos 1.8mg. de RNA total. La presencia en muchos RNAm eucariontes de largos tramos de Poli(A) en su extremo 3' no traducido, permite separarlos del resto de los RNAs celulares mediante cromatografía de afinidad, usando como resina oligo d(T) celulosa (Fig. 5) (1,33,38). Mediante este proceso se recuperaron al final aproximadamente 10ug de Poli(A)<sup>+</sup>, de los cuales un porcentaje bajo corresponde a interferón.

b) PREPARACION DEL cDNA: La enzima transcriptasa reversa usa como templado RNAm para generar cDNA. Esto ocurre en presencia

de un oligonucleótido que funcione como primero de la transcripción y de los cuatro deoxiribonucleósidos trifosfato (Fig. 5). (33,38,48). Esta enzima se ha usado anteriormente en la clonación de varios genes eucariontes de los cuales se tenía sus respectivos RNAm. Entre los genes que se han clonado por este método figuran:  $\beta$  globina (14,34), ovoalbúmina (43), insulina (66), interferón (18,40).

En nuestro caso, se usó como primero para la transcriptasa reversa un oligonucleótido sintético de 12 bases de longitud, en el cual hibridiza específicamente contra una secuencia del extremo 3' no traducido del gene de interferón. El uso de este primero nos debía permitir generar cDNAs específicos de interferón leucocitario.

Al calcular la complejidad del RNAm de una célula eucarionte, considerando que existan unos 15000 RNAm diferentes de los pocos abundantes con una longitud promedio de 2000 bases, obtenemos un valor de  $3 \times 10^7$ . Estimando entonces el número de RNAm diferentes con posibilidades de hibridizar contra el primero sintético de 12 bases de largo llegamos a que

$$(0.25)^{12} \times 3.10^7 = 1.8$$

Este valor nos indica que había una mayor probabilidad de que solo dos RNAm diferentes dieran origen a los cDNAs. Esto nos decía que estrictamente los cDNAs obtenidos, serían en su mayoría correspondientes a interferón.

Comparaciones realizadas a nivel nucleotídico entre los dife

## METODOLOGIA

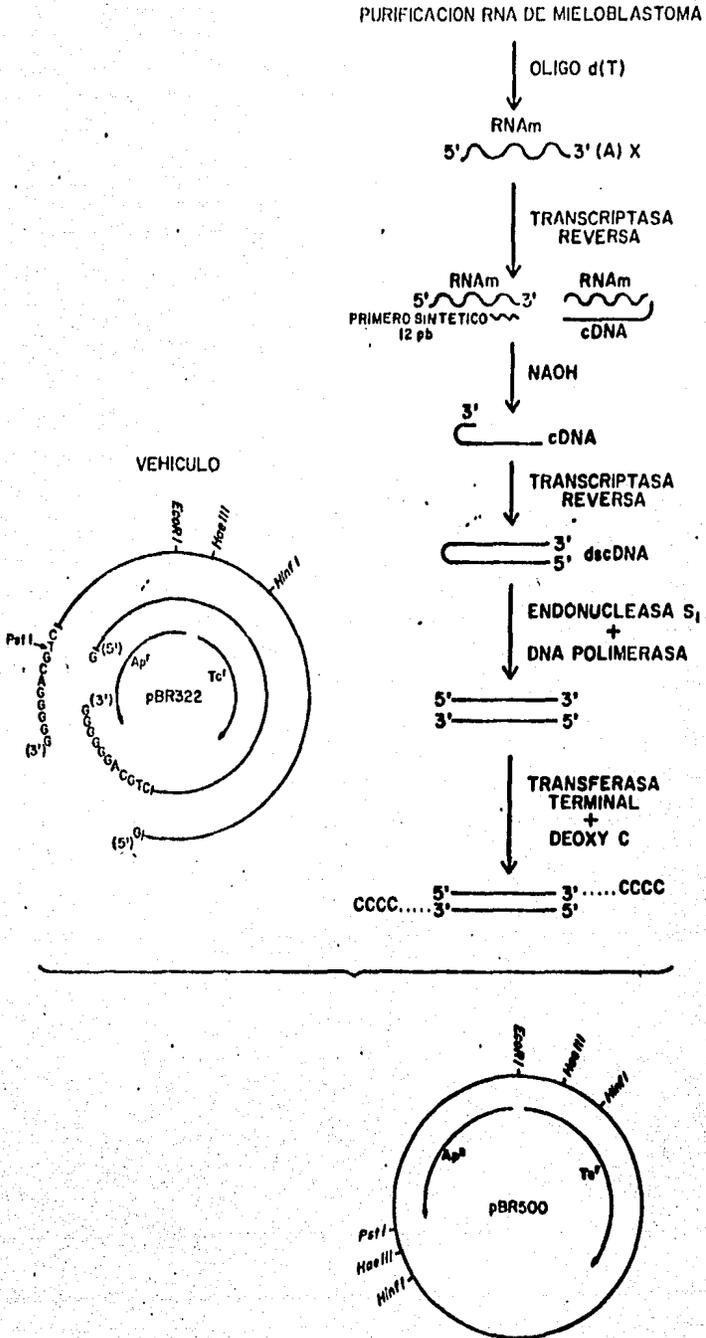


Fig. 5 Proceso seguido en la preparación y clonación del cDNA de interferón.

rentes genes para interferón leucocitario indicaban que las homologías de las regiones 3' no traducidas, no eran tal elevadas como ocurre con la región del péptido maduro. Realizando la misma comparación, pero ahora entre los genes  $\alpha$  y  $\beta$  en su región 3', se observa que las homologías son muy bajas y con respecto al gene  $\gamma$  son despreciables (20).

Esto nos condujo al supuesto de que al construir el cDNA con el primero específico contra la región 3', en teoría los cDNAs obtenidos corresponderían a varios de los genes leucocitarios.

Por otro lado, el hecho de que normalmente la representación de los RNAm de los diferentes genes leucocitarios en la célula sea de un 42% del gene A, un 27% del D y un porcentaje entre 3 y 6% para los restantes (20)(Fig. 2), nos sugería que el cDNA que preferencialmente obtendríamos sería el correspondiente al tipo A.

Al construir el cDNA es muy importante la relación cuantitativa entre el poli(A) y la transcriptasa reversa en la reacción. En general es conveniente usar un exceso de enzima, lo cual incrementa la cantidad y longitud del cDNA generado (33,38).

Otros detalles importantes en la construcción del cDNA son: usar altas concentraciones de los cuatro deoxinucleósidos trifosfato (disminuciones de 50 a 10  $\mu$ M en su concentración reducen mucho la eficiencia de la reacción), trabajar a un pH de 8.3 dado que un desvío de  $\pm$  0.5 unidades disminuye la eficiencia unas 5

veces (33,38).

En nuestro caso se obtuvieron aproximadamente 56ng de cDNA cadena sencilla.

En la preparación de la segunda cadena de cDNA se usó como primero para la transcriptasa reversa la estructura de "hairpin", que por mecanismos que no se conoce, se sabe que se genera en el extremo 3' del cDNA cadena sencilla por la misma enzima durante el proceso de polimerización (Fig. 5) (14,33,38). Obtuvimos unos 100 ng. de cDNA doble cadena.

Al construir las dos cadenas del cDNA, estas se encuentran covalentemente unidas a través del hairpin. Se hace necesario entonces, digerir esta estructura con la nucleasa S1, la cual es específica para cadena sencilla (33,38). Los extremos que se generan en el cDNA, posteriormente a este tratamiento, no son siempre perfectamente rasurados por lo cual se les repara con DNA polimerasa I (Fragmento Klenow) para mejorar la eficiencia de la clonación posterior (Fig. 5) (51).

Al realizar electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% de el cDNA obtenido se observa la existencia de una sola banda prominente de aproximadamente 1500 pb (Fig. 5').

El encontrar claramente favorecida esta población de cDNA, en lugar de una colección de diferentes tamaños es consistente con el uso del primero específico de interferón, en particular si además consideramos que los RNAm de interferón leucocitario for-

cDNA  
RNA cDNA ds



Fig. 5' Gel de acrilamida al 7.5% donde se observa en el punto señalado por la flecha, la presencia de -- una banda prominente de DNA.

cDNA - DNA complementario cadena sencilla

cDNAds-DNA complementario doble cadena.

man una población bastante homogénea en tamaño. Por otro lado se sabe que la transcriptasa reversa al copiar al RNAm se detiene preferencialmente en determinadas secuencias nucleotídicas (33).

c) CLONACION MOLECULAR DE DNA: La estrategia que usamos a estos efectos fué la de agregar homopolímeros de deoxiC al cDNA mediante la enzima transferasa terminal (Fig. 5). La aplicación de esta técnica presenta la ventaja de que usando como vehículo de clonación algún plásmido que tenga agregados homopolímeros de deoxiG en el sitio de reconocimiento de la endonucleasa PstI, luego fácilmente se puede extraer el fragmento insertado en ese sitio, digiriendo con PstI, dado que este procedimiento regenera los dos sitios para esa enzima a ambos lados del inserto (4,66). La eficiencia con la cual se regeneran estos sitios va a depender en parte de la enzima terminal transferasa usada (33). El número óptimo de colas de deoxiC y deoxiG que se deben agregar se estima que es de 20 (38).

Luego de ligar el vehículo al cDNA se transformó en una cepa de E. coli K12 RR1 recA<sup>-</sup>, seleccionándose las colonias recombinantes como Tc<sup>r</sup> Ap<sup>S</sup>. El número aproximado de transformantes esperado según reportes de New England Nuclear, proveedores de el plásmido pBR322 con las colas de deoxiG era de  $2 \times 10^3$  x µg de plásmido. Los reportes dados por otros autores que clonaron

cDNAs de interferón por el mismo método, son también de 1000 transformantes x µg de cDNA (18). En nuestro caso se obtuvieron solamente dos transformantes a partir de 24 ng de cDNA, debiéndose haber obtenido aproximadamente 50 transformantes.

Entre las posibles causas que podrían explicar nuestro bajo rendimiento podríamos anotar que las cepas de E. coli recA<sup>-</sup> dan menos transformantes al usar cDNA con colas de homopolímeros, que las cepas recA<sup>+</sup> (33). Se usó la cepa recA<sup>-</sup> para evitar posibles recombinaciones en el caso de que se transformara con plásmidos que llevaran insertos diferentes, pero con un grado elevado de homología. Aparentemente el sistema recA bacteriano se encuentra involucrado en la reparación del DNA circular abierto y de las moléculas híbridas de DNA con residuos de homopolímeros (33).

También podemos pensar en varias otras posibilidades; como ser que las células receptoras no fuesen totalmente competentes en el momento de la transformación o bien que los plásmidos no se hayan recircularizado, pudiéndose haber degradado por la acción de nucleasas.

d) CARACTERIZACION DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA CLONADOS: Los plásmidos aislados de las dos colonias se denominaron pBR500 y pBR501. A ambos se les realizaron mapas de restricción con diferentes endonucleasas de donde fué posible inferir: (Fig. 6)

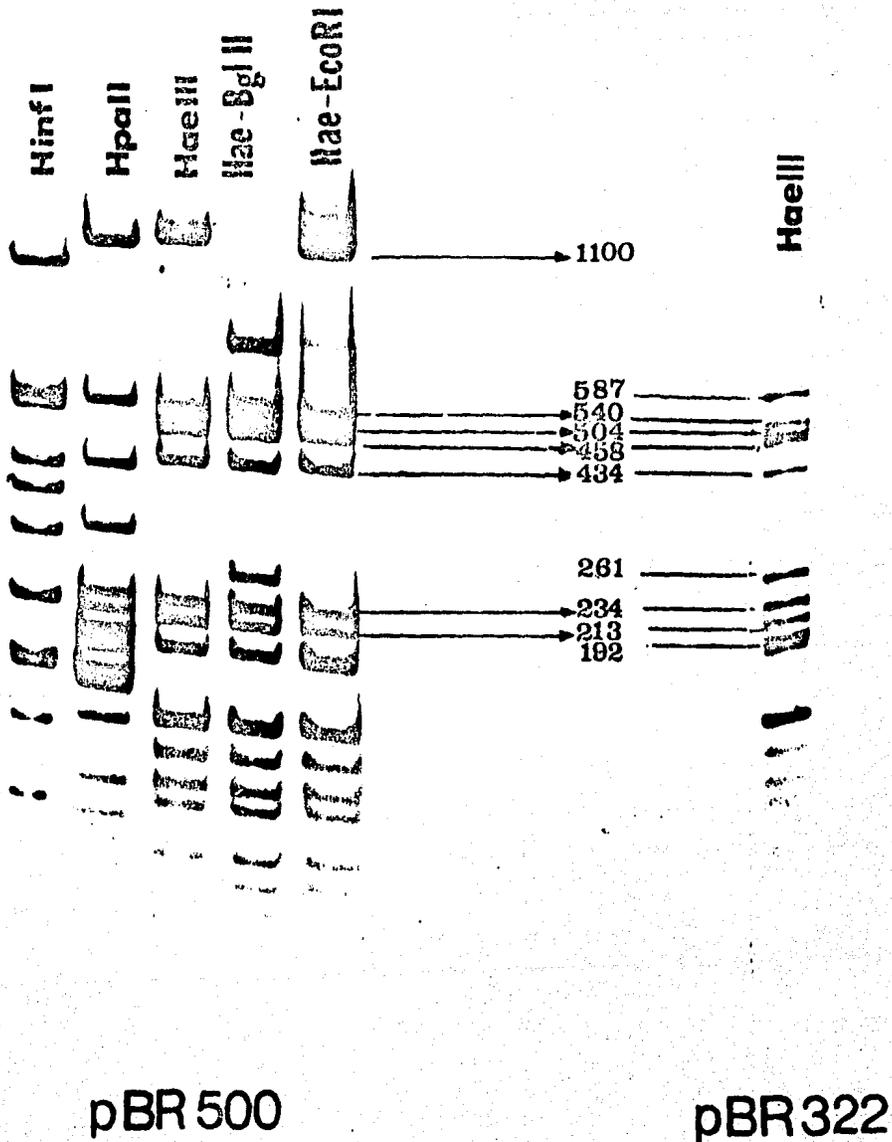


Fig. 6 Patrones de restricción del pBR500 comparado con el pBR322 original.

\* Ambos plásmidos habían regenerado solo uno de los dos sitios de PstI esperados.

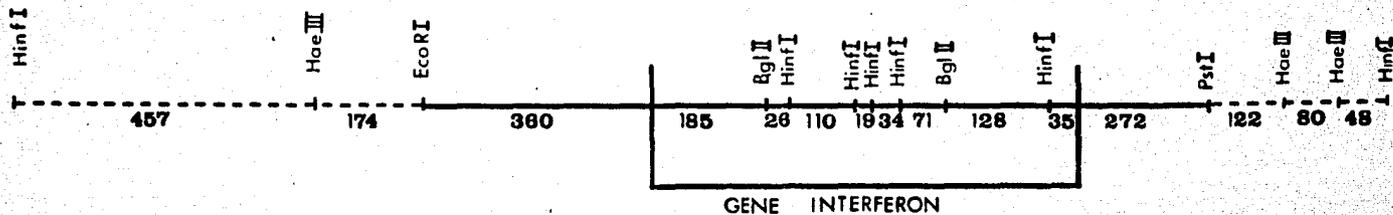
\* En ambos habían ocurrido deleciones de regiones del vehículo original e inserciones de DNAs heterólogos en sitios diferentes. El pBR500 poseía una deleción en la región del pBR322 original, que estaba comprendida entre los sitios de EcoRI y PstI, insertándose en ese sitio un fragmento de DNA de aproximadamente 1250 pb. El pBR501 tenía numerosas deleciones pequeñas en diferentes regiones del vehículo, así como varias inserciones de DNA en distintos sitios. Digiriéndolo con la endonucleasa HaeIII, resultaba claro que el inserto no correspondía a ninguno de los genes de interferón, dado que poseía numerosos sitios para esta enzima cosa que no ocurre en ninguno de los genes reportados. Esto hizo que este plásmido fuera descartado para posteriores estudios.

\* Al digerir el pBR500 con varias endonucleasas cuyos sitios de corte en los genes de interferón han sido reportados (Fig. 2) (18,20,45), nos fué posible determinar que el fragmento de 1250 pb que se había insertado en este plásmido, contenía varios sitios de restricción en posiciones coincidentes con el gene de interferón leucocitario A y que carecía de otros que se sabe que no posee este gene. En particular era muy claro que cuando lo digeríamos con la enzima Bgl II, se generaba un fragmento de 260pb que correspondía exactamente con uno reportado para el

gene leucocitario A (Fig. 7) (18).

\* Aproximadamente 600pb del inserto correspondían al gene para interferón, pero a ambos lados de este había regiones de DNA que no correspondían ni al gene de interferón, ni al vehículo pBR322 (Fig. 7). Deleciones e inserciones como las ocurridas en nuestro caso, pese a que trabajamos con cepas de *E. coli recA<sup>-</sup>*, ya han sido reportadas aunque las razones por las cuales esto ocurre aún no se conocen. Fiers et al., (67) usando una metodología similar a la nuestra pero con el gene de interferón de fibroblasto, ha observado de igual forma fenómenos aberrantes durante la clonación, como el hecho de encontrar plásmidos con insertos con una región 5' invertida de varios cientos de pares de bases o con una duplicación parcial del extremo 3', el cual se invierte y se liga al extremo 5' del cDNA. Además en ningún caso han logrado clonar fragmentos de cDNA pequeños.

Entre las posibles explicaciones que dan a estos fenómenos se encuentra de que no necesariamente siempre que se usa la transcriptasa reversa en la construcción de la primera cadena del cDNA, se forma el "hairpin" en el extremo 3'. Esto se puede deber a la falta de secuencias complementarias en el extremo 3' o a que se puede bloquear la elongación del asa por estructuras secundarias del DNA. En este caso, la segunda hebra del DNA se forma cuando el extremo 3' del cDNA cadena sencilla encuentra otras regiones con las cuales aparearse. Una actividad de nu-



--- VEHICULO  
 — FRAGMENTO INSERTADO

Fig. 7. Mapa de restricción del pBR500

cleasa, posterior a la desestructuración del asa generaría los dos tipos de rearreglos observados. Sin embargo, no es posible concluir que en nuestro caso hayan ocurrido fenómenos similares. Los fenómenos aberrantes aquí observados resultan difíciles de explicar aunque en muchos casos en que se ha clonado cDNA en forma similar a la aquí usada reportan la ocurrencia de hechos parecidos (14,34,67). En general los autores nos han analizado las posibles causas que originan estos fenómenos, por lo cual nos resulta aún más difícil encontrar referencias que aporten cierta explicación sobre ellos.

e) SECUENCIA DE DNA: Se efectuó con el fin de confirmar que el inserto del pBR500 contenía el cDNA para interferón leucocitario A y que éste se encontraba completo. Se usó el fago M13 (37) como vehículo portador de la región de DNA a secuenciar.

Al insertar un fragmento adicional de DNA en estos vectores se destruye la complementación de  $\beta$  galactosidasa dando placas blancas.

El inserto EcoRI-PstI del pBR500 fué subclonado en tres derivados del M13 en la siguiente forma: (Fig. 7).

- el fragmento interno Bgl II-Bgl II de 260pb en el fago M13 mp7 en el sitio para BamHI.
- el fragmento de EcoRI-Bgl II de 560pb en el fago M13 mp8 en los sitios EcoRI-BamHI

- el fragmento PstI-Bq1 II de 439pb en el fago M13 mp9 en los sitios PstI-BamHI.

La secuencia nucleotídica de estos tres fragmentos confirmó que el pBR500 llevaba un inserto que correspondía al gene de interferón leucocitario A, dado que coincidía perfectamente con las secuencias ya reportadas (Fig. 8) (18).

De los 1240pb totales del inserto que habíamos clonado, solo una parte correspondía al gene de interferón y comprendía desde el primer aminoácido del péptido maduro, hasta 20pb después del codón TGA de terminación de la traducción (Fig. 1).

Las regiones de DNA que se clonaron a ambos lados del gene de interferón no sabemos aún a que corresponden.

Entre las posibles hipótesis que nos permitirían explicar el origen de estas secuencias de DNA heterólogas podríamos incluir:

- ) que el RNAm que dió origen a este cDNA para el interferón leucocitario tipo A fuese diferente por lo menos a nivel del péptido líder y la región 5' de los ya reportados.

Dado que en nuestro caso el RNAm ha sido purificado de un tumor, sería posible pensar en la ocurrencia de diferencias en el RNAm en esas regiones.

Sin embargo, el hecho que todas las secuencias reportadas para los interferones leucocitarios poseen los aminoácidos glicina y cisteína en el sitio de procesamiento del péptido líder y que la glicina no se encuentra en nuestra secuencia



Fig. 8 Secuencia nucleotídica parcial del fragmento EcoRI - BglII del cDNA de interferón leucocitario humano tipo A subclonado en el fago M13 mp8. Las flechas en la figura 1 indican la región que aparece aquí leída a la derecha.

hace poco probable esta hipótesis. Por otro lado esto tampoco explica el origen del DNA heterólogo que aparece hacia el extremo 3'.

-) que se hayan originado a partir de mecanismos de recombinación, inversiones, duplicaciones o bien que provengan de un RNAm diferente al de interferón que luego por algún mecanismo que ignoramos se ligó al cDNA del interferón.

f) CONCLUSIONES: Las técnicas utilizadas indican que se ha clonado el gene que codifica para interferón leucocitario A humano. La clonación de este gene nos permitirá en un futuro construir un sistema para su expresión en forma eficiente, verificándose entonces su actividad biológica.

Asimismo, permitirá usar a este gene como probador a los efectos de aislar de un banco genómico humano, otros de los genes para interferón, pudiéndose generar después diferentes híbridos entre ellos.

REFERENCIAS:

1. AVIV, H., LEDER, P. (1972). Purification of Biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69: 1408-1412.
2. BALKWILL, F. (1980). What future for the interferons. New Scientist 85: 230-232.
3. BETLACH, M., HERSCHFELD, V., CHOW, B., BROWN, W., GOODMAN, H., BOYER, H.W. (1976). A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the EcoRI restriction and modification of DNA. Federation Proc. 35: 2037-2043.
4. BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNEKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.H., FALCOW, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A Multipurpose cloning system. Gene 2: 95-113.
5. BRACK, C., NAGATA, S., MANTEI, N., WEISSMANN, C., (1981). Molecular analysis of the human interferon  $\alpha$  gene family. Gene 15: 379-394.
6. BRANCA, A.A., BAGLIONI, C. (1981). Evidence that types I and II interferons have different receptors. Nature (London) 294: 768-770.
7. CANTELL, K., HIRVONEN, S. (1977). Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. Tex. Rep. Biol. Med. 35: 138-144.
8. COHEN, S., CHANG, A., BOYER, H.W., HELLING, R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids

- in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70: 3240-3244.
9. DEGRADO, W.F., WASSERMAN, Z.R., CHOWDHRY, W. (1982). Sequence and structural homologies among type I and type II interferons. Nature (London) 300: 379-381.
  10. DEGRAVE, W., DERYNCK, R., TAVERNIER, J., HAEGEMAN, G., FIERS, W., (1981). Nucleotide sequence of the chromosomal gene for human fibroblast ( $\beta_1$ ) interferon and of the flanking regions. Gene 14: 137-143.
  11. DERYNCK, R., CONTENT, J., DECLERQ, E., VOLCKAERT, G., TAVERNIER, J., DEVOS, R., FIERS, W. (1980). Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. Nature (London) 285: 542-546.
  12. DERYNCK, R., REMAUT, E., SAMAN, E., STANSSENS, P., DECLERQ, E., CONTENT, J., FIERS, W. (1980). Expression of human fibroblast interferon gene in E. coli. Nature (London) 287: 193-197.
  13. EDGE, M.D., GREENE, A.R., HEATHCLIFFE, G.R., MEACOCK, P.A., SCHUCH, W., SCANLON, D.B., ATKINSON, T.C., NEWTON, C.R., MARKHAM, A.F. (1981). Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. Nature (London) 292: 756-762.
  14. EFSTRATIADIS, A., KAFATOS, F.C., MAXAM, A.M., MANIATIS, T. (1976). Enzymatic in vitro synthesis of globin genes. Cell 7: 279-288.
  15. EPSTEIN, L.B. (1982). Interferon gamma; success, structure - and speculation. Nature (London) 295: 453-454.
  16. FRANKE, A.E., SHEPARD, H.M., HOUCK, C.M., LEUNG, D.W., GOEDDEL, D.V., LAWN, R.M. (1982). Carboxyterminal region of hybrid -- leukocyte interferons affects antiviral specificity. DNA: 1

(3): 223-230.

17. FRIEDMAN, R.M. (1979). Interferons: Interactions with cell - surfaces. *Interferon*: 1: 53-74.
18. GOEDEL, D.V., YELVERTON, E., ULLRICH, A., HEYNEKER, H.L., --- MIOZZARI, G., HOLMER, W., SEEBURG, P.H., DULL, T., MAY, L., -- STEBBING, N., CREA, R., MAEDA, S., McCANDLISS, R., SLOMA, A., TABOR, J.M., GROSS, M., FAMILLETTI, P.C., PESTKA, S. (1980). Human - leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically -- active. *Nature (London)* 287: 411-416.
19. GOEDEL, D.V., SHEPARD, H.M., YELVERTON, E., LEUNG, D., CREA, R. SLOMA, A., PESTKA, S. (1980). Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*, *Nucleic Acids Res.* 8: 4057-4074.
20. GOEDEL, D.V., LEUNG, D.W., DULL, T.J., GROSS, M., LAWN, R.M., - MACCANDLISS, R., SEEBURG, P.H., ULLRICH, A., YELVERTON, E., GRAY, P.W. (1981). The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. *Nature (London)* 290: 20-26.
21. GRAY, P.W., GOEDEL, D.V. (1982). Structure of the human -- immune interferon gene. *Nature (London)* 298: 859-863.
22. GRAY, P.W., LEUNG, D.W., PENNICA, D., YELVERTON, E., NAJARIAN, R., SIMONSEN, C.C., DERYNCK, R., SHERWOOD, P.J., WALLACE, D, M., BERGER, S.L., LEVINSON, A.D., GOEDEL, D.V. (1982). Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature (London)* 295: 503-508.
23. GUTTERMAN, J.U., FINE, S., QUESADA, J., HORNING, S.J., LEVINE, J. F., ALEXANIAN, R., BERNHARDT, L., KRAMER, M., SPIEGEL, H., --- COLBURN, W., TROWN, P., MERIGAN, T., DZIEWANOWSKA, Z. (1982). *Ann. Intern. Med.* 96: 549-556.

24. HITZEMAN, R.A., HAGIE, F.E., LEVINE, H.L., GOEDDEL, D.V., ---  
AMMERER, G., HALL, B.D. (1981). Expression of a human gene  
for interferon in yeast. *Nature (London)* 293: 717-722.
25. HOUGHTON, M., JACKSON, I.J., PORTER, A.G., DOEL, S.M., CATLIN,  
G.H., BARBER, C., CARET, N.H. (1981). The absence of introns  
within a human fibroblast interferon gene. *Nucleic Acids -  
Res.* 9: 247-266.
26. INTERFERON NOMENCLATURE. (1980) *Nature (London)* 286: 110.
27. LAWN, R.M., GROSS, M., HOUCK, C.M., FRANKE, A.E., GRAY, P.W., --  
GOEDDEL, D.V. (1981) DNA sequence of a major human leukocyte  
interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 5435-5439.
28. LAWN, R.M., ADELMAN, J., DULL, T.J., GROSS, M., GOEDDEL, D.V., -  
ULLRICH, A. (1981). DNA sequence of two closely linked human  
leukocyte interferon genes, *Science* 212: 1159-1162.
29. LAWN, R.M., ADELMAN, J., FRANKE, A.E., HOUCK, C.M., GROSS, M., -  
NAJARIAN, R., GOEDDEL, D.V. (1981). Human fibroblast interfe  
ron gene lacks introns. *Nucleic Acid Res.* 9: 1045-1052.
30. LENGYEL, P. (1982). Biochemistry of interferons and their --  
actions. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 251-282.
31. LEVY, W.P., RUBINSTEIN, M., SHIVELY, J., DEL VALLE, U., LAICHY,  
MOSCHERA, J., BRINK, L., GERBER, L., STEIN, S., PESTKA, S. (1981).  
Amino acid sequence of a human leukocyte interferon. *Proc. --  
Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 6186-6190.
32. LIN, S.L., GREENE, J.J., TS'0, P.O., CARTER, W.A., (1982).  
Sensitivity and resistance of human tumor cells to interfe  
ron and rIn.rCn. *Nature (London)* 297: 417-419.
33. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1982) *Molecular --  
Cloning Laboratory Manual.* 212-246 (Cold Spring Harbor Labo-

ratory).

34. MANIATIS, T., KEE, G., EFSTRATIADIS, A., KAFATOS, F. C. (1976). Amplification and characterization of a  $\beta$ -globin gene synthesized in vitro. *Cell* 8: 1630.
35. MANTEI, N., WEISSMANN, C., (1982) Controlled transcription of a human  $\alpha$  interferon gene introduced into mouse L cells. *Nature* (London) 297: 128-132.
36. MARCUCCI, F., WALLER, M., KIRCHNER, H., KRAMMER, P. (1981). Production of immune interferon by murine T cells clones - from long term cultures. *Nature* (London) 291: 79-81.
37. MESSING, J., CREA, R., SEEBURG, P. H., (1981) A system for - shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 9: 309-321.
38. METHODS IN ENZIMOLOGY (1979) 68: 41-50;75-90 (Academic Press New York).
39. MORSER, J., COLMAN, A. (1980) Post translational events in the production of human lymphoblastoid interferon. *J. Gen. Virol.* 51: 117-124.
40. NAGATA, S., TAIRA, H., HALL, A., JOHNSRUD, L., STREULI, M., ECSUDI, J., BOLL, W., CANTELL, K., WEISSMANN, C., (1980). Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* (London) 284:316-320.
41. NAGATA, S., MANTEI, N., WEISSMANN, C., (1980) The structure - of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon- $\alpha$ . *Nature* (London) 287: 401-408.
42. OHNO, S., TANIGUCHI, I., (1981) Structure of a chromosomal - gene for human interferon  $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 5305-5309.

43. O'MALLEY, B.W., WOO, L.C., MONAHAN, J.J., McREYNOLDS, L., HARRIS, S.E., TSAI, M.J., TSAI, S.Y., MEANS, AR., (1976) in Control of gene expression (Academic Press New York).
44. OWERBACH, D., RUTTER, W.J., SHOWS, T.B., GRAY, P., GOEDDEL, D.V., LAWN, R.M., (1981). Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. Proc. Natl. Acad. Sci. -- (USA) 78:3123-3127.
45. PESTKA, S., (1983) The human interferons-From protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, and beyond. Arch. Biochem. Bioph. 221;1-37.
46. QUESADA, J.R., SWANSON, D.A., TRINDADE, A., GUTTERMAN, J.U., (1983) Renal cell carcinoma, antitumor effects of leukocyte interferon. Cancer Research 43; 940-947.
47. REPORT ON A WORKSHOP ON DNA RECOMBINANT TECHNOLOGY IN INTERFERON CLONING. (1981) The journal of infectious diseases 143: 297-300.
48. ROUGEON, F., KOURILSKY, F., MARCH, F., (1975) Insertion of a -- rabbit  $\beta$ -globin gene sequence into an E. coli plasmid. Nucleic Acids Res. 2: 2365-2378.
49. RUBINSTEIN, M., RUBINSTEIN, S., FAMILLETTI, P.C., MILLER, R.S., -- WALDMAN, A.A., PESTKA, S., (1979). Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity and initial characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 640-644.
50. SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74: 5463-5467.

51. SEEBURG, P.H., SHINE, J., MARTIAL, J.A., BAXTER, J.D., GOODMAN, H.M., (1977) Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. Nature -- (London) 270: 486-494.
52. SHEPARD, H.M., YELVERTON, E., GOEDEL, D.V., (1982) Increased synthesis in E. coli of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome binding sites. DNA 1: 125-131.
53. SIKORA, K., (1980) Does interferon cure cancer?. British -- Medical Journal 281; 855-858.
54. SLOCOMBE, P., EASTON, A., BOSELEY, P., BURKE, D.C., (1982). High level expression of an interferon  $\alpha_2$  gene cloned in -- phage M13mp7 and subsequent purification with a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 5455-5459.
55. STEWART, W.E.II. (1979) The Interferon System. (Springer---- Verlag, New York).
56. STEWART, W.E.II. (1979) Varied Biological effects on interferon. Interferon 1: 29-51.
57. TAN, Y.H., TAN, C., BERTHOLD, W., (1977) Genetic control of the interferon system. Tex. Rep. Biol. Med. 35: 63-68.
58. TANIGUCHI, I., MANTEI, N., SCHWARSTEIN, M., NAGATA, S., MURAMATSU, M., WEISSMANN, C., (1980) Human leukocyte and fibroblast -- interferons are structurally related. Nature (London) 285: 547-549.
59. TAVERNIER, J., DERYNCK, R., FIERS, W., (1980) Evidence for a -- unique human fibroblast interferon (IFN- $\beta_1$ ) chromosomal -- gene, devoid of intervening sequences. Nucleic Acid Res. 9:

461-471.

60. TRENT, J.M., OLSON, S., LAWN, R.M. (1982) Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast and immune interferon -- genes by means of in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7809-7813.
61. TUITE, M.F., DOBSON, M.J., ROBERTS, N.A., KING, R.M., BURKE, D.C., KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J. (1982) Regulated high efficiency expression of human interferon alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. The Embo Journal 1: 603-608.
62. ULLRICH, A., SHINE, J., CHIRGWIN, J., PICTET, R., TISCHER, E., RUTTER, W.J., GOODMAN, H.M. (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. Science 196: 1313-1318.
63. WECK, P.K., APPERSON, S., STEBBING, N., GRAY, P.W., LEUNG, D., SHEPARD, H.M., GOEDEL, D.V. (1981) Antiviral activities of hybrids of two major human leukocyte interferons. Nucleic Acids Res. 9: 6153-6166.
64. WHITAKER-DOWLING, P.A., WILCOX, D.K., WIDNELL, C.C., YOUNGNER, J. S., (1983) Interferon mediated inhibition of virus penetration. Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 80: 1083-1086.
65. WILLIAMS, B.R.G., KERR, I.M. (1980) The 2-5A (pppA<sup>2'</sup> p<sup>5'</sup> A<sup>2'</sup> p<sup>5'</sup> A) system in interferon treated and control cells. TIBS (Mayo) 138-140.
66. VILLA KOMAROFF, L., EFSTRATIADIS, A., BROOME, S., LOMEDICO, P., TIZARD, R., NABER, S.P., CHICH, W.L., GILBERT, W. (1978). A bacterial clone synthesizing proinsulin. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75: 3727-3731,

67. VOLCKAERT, G., TAVERNIER, J., DERYNCK, R., DEVOS, R., FIERS, W., (1981). Molecular mechanisms of nucleotide sequence rearrangements in cDNA clones of human fibroblast interferon mRNA. Gene 15: 215-223.
68. YELVERTON, E., LEUNG, D., WECK, P., GRAY, P.W., GOEDEL, D.V., -- (1981) Bacterial synthesis of a novel human leukocyte interferon. Nucleic Acid Res. 9: 731-741.