

Construcción, clonación y expresión de un gen sintético para el inhibidor de carboxipeptidasa de patata

Miguel A. Molina, Cristina Marino, Baldomero Oliva, Xavier Daura, Francesc Canals, Enrique Querol y Francesc X. Avilés.

Institut de Biologia Fonamental i Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona)

INTRODUCCION

El ICP es una proteína de 39 residuos (Hass et al, 1979) que inhibe competitivamente a la carboxipeptidasa. Obtener ICP recombinante producido por *E. coli* es de gran interés, pues permite, una vez optimizada dicha expresión, tener grandes cantidades del mismo con el cual estudiar sus posibles aplicaciones biotecnológicas, dado el enorme interés económico e industrial de los inhibidores de proteasas (Bullock and Kristiansen, 1987). El ICP presenta el interés añadido de que recientemente se ha descubierto que inhibe la transformación tumoral inducida por radiación de células en cultivo (Billings et al, 1989). También permite aplicar al ICP técnicas de ingeniería de proteínas (Robson and Garnier, 1986) para estudiar la relación secuencia de aminoácidos-plegamiento-función.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Obtención de un gen sintético para el ICP

En primer lugar se procedió al diseño de un gen sintético para el ICP a partir de la secuencia de aminoácidos de éste. En dicho diseño se usaron los codones óptimos utilizados por *E. coli* (Sharp et al., 1988) excepto en ciertos puntos en que se usaron otros para crear puntos de corte por enzimas de restricción. Delante de la secuencia codificadora para el ICP se añadieron codones para Ile-Glu-Gly-Arg-Met. Esto se hizo para permitir que, si se decidía tal cosa, el gen pudiera expresarse como proteína de fusión (los cuatro primeros aa de la secuencia citada son el punto de corte del factor Xa, y la Met del BrCN) o en solitario (el codón Met es el de iniciación de la traducción). A ambos lados del gen se colocaron extremos cohesivos Sall.

Una vez diseñado el gen sintético, dado que tenía 150 pb, se hubieron de diseñar oligonucleótidos de menor tamaño (que pudieran ser sintetizados con los sintetizadores de oligos actuales) solapantes entre sí de forma que al reunirse pudieran hibridar entre ellos y ligarse para formar el gen completo. El diseño de los oligos se hizo de forma que los que debían hibridar presentasen la máxima complementariedad y los que no debían la mínima. También se diseñó un procedimiento para construir el gen a partir

de los oligonucleótidos en dos pasos.

A continuación se sintetizaron los oligos monohebra previamente diseñados, y se purificaron. Una vez purificados se ligaron en dos segmentos por separado según el método descrito por Frank et al. (1987). Dichos segmentos se purificaron por electroforesis en agarosa para luego ligarlos, dando lugar al gen completo, que seguidamente se purificó.

Una vez tuvimos el gen sintético purificado, se ligó al sitio Sal I del plásmido pBR322 dando lugar al vector pBR322-ICP1. A continuación se procedió a la secuenciación del gen ICP sintético. Para ello se clonó en el bacteriófago M13mp19 (Messing, 1983) y se secuenció según el método dideoxi (Sanger et al, 1977).

2. Obtención del vector pIMAM1. Expresión del ICP_r+10

Para la expresión del gen ICP sintético se eligió el vector de secreción pNIII-ompA3 (Ghrayeb et al, 1984). La razón para escoger dicho plásmido ha sido que este se ha usado para expresar un inhibidor estructuralmente similar al ICP (Maywald et al, 1988). Como dicho vector no presenta lugar de clonación Sal I y el gen ICP sintético tiene extremos Sal I, para clonarlo en el vector se tuvo previamente que convertir los extremos del gen en romos y ligarle linkers Eco RI para luego ligarlo al vector y transformar en *E. coli* HB101. Para ello, como para el resto de técnicas de DNA recombinante usadas, se siguieron los protocolos descritos en Maniatis et al (1989) y Ausubel et al (1987). Así se obtuvo un vector pNIII-ompA3 con el gen ICP colocado en el lugar de clonación EcoRI, vector bautizado como pIMAM1. De dicho vector se obtuvieron los fragmentos XbaI-HindIII y EcoRI-EcoRI y se clonaron en M13mp18. El primer fragmento contiene la secuencia codificante del péptido señal omp A y la primera parte del gen; el segundo todo el gen. Dichos fragmentos se secuenciaron y se vio que el gen ICP del vector pIMAM1 tiene la secuencia correcta y está insertado en el marco de lectura adecuado.

Se llevó a cabo a continuación un análisis sobre si la cepa HB101 (pIMAM1) expresa el gen ICP y produce ICP recombinante. Para ello se hizo crecer dicha cepa a 30°C en medio M9+0,2% casaminoácidos, se indujo la expresión del gen (por adición de IPTG 2mM) y se obtuvieron a partir de dichos cultivos tres fracciones, correspondientes a medio extracelular, espacio periplásmico y medio intracelular. Análisis inmunológicos (ELISA) usando los anticuerpos anti-ICP de conejo obtenidos y pruebas de actividad (Hass et al, 1981) nos han permitido determinar la presencia de ICP recombinante activo en los cultivos inducidos de HB101 (pIMAM 1). Dicho ICP se localiza de forma prácticamente exclusiva en el medio extracelular, a una concentración muy baja, de 30-50µg/l. Esto concuerda con lo esperado, dado que un inhibidor de tripsina estructuralmente similar al ICP fue expresado también mediante el vector pNIII-ompA3 y aparecía asimismo en el medio de cultivo (Maywald et al,1988).

El ICP recombinante, dada la secuencia del gen, del propio vector pNIII-ompA3 y el hecho de que se hubieran de añadir linkers para insertarlo en dicho vector, presentaba 10 aminoácidos extra en su extremo N-terminal respecto al inhibidor nativo, por lo que se denominó ICP_r+10.

3. Obtención del vector pIMAM3. Expresión del ICP_r

Como se describió en el apartado anterior, se había construido el vector pIMAM1 uniendo linkers EcoRI al gen sintético para el ICP y clonándolo en el sitio EcoRI del vector pNIII-ompA3 (Ghrayeb et al., 1984). De dicho vector

se obtuvieron los fragmentos Xba-Hind III (que comprende el péptido señal ompA y parte del gen) y EcoRI-EcoRI (que comprende el gen) y se clonaron en el vector M13mp18, originando los vectores M13-PCIXH12 y M13-PCIE12, respectivamente. Los fragmentos clonados en ambos vectores se

secuenciaron. Se diseñó un oligonucleótido para deleccionar el fragmento de 30 pb correspondiente a los 10 aminoácidos adicionales del ICP+10. Usando dicho oligo se realizó una mutagénesis dirigida según el método de Nakayama and Eckstein (1986) sobre el vector M13-ICPXH12, obteniendo el vector M13-ICPD2, que presentaba la delección. Dicho vector se cortó con XbaI+HindIII, el fragmento de 160 pb resultante se ligó al fragmento XbaI-HindIII de 7000 pb del vector pMAM1, originando el plásmido pMAM2. El fragmento BamHI de 7500 pb de pMAM2 se ligó al fragmento BamHI de 130 pb de pMAM1, originando el vector pMAM3. En él el primer codón del gen del ICP sigue directamente al último residuo del péptido señal de secreción ompA. El fragmento XbaI-EcoRI de pMAM3, que comprende el péptido señal ompA y el gen ICP, se clonó en M13mp18 (originando el vector M13-PCIF1) y secuenció, comprobándose que el gen tenía la secuencia correcta y estaba insertado en marco de lectura.

Para expresar el ICP recombinante sin aminoácidos adicionales (ICPr) se hizo crecer la cepa de E. coli MC1061 transformada con pMAM1 o pMAM3 en medio M9CAS+50 µg/ml de ampicilina, a 37°C; induciéndose la expresión del gen mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,2 ó 2mM. 24 horas después de la inducción, los cultivos se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante para cuantificar la cantidad de ICPr presente en él. Dichas cuantificaciones se realizaron mediante pruebas de actividad inhibitora de carboxipeptidasa (Hass and Ryan, 1981) y tests ELISA usando los anticuerpos anti-ICP de que se disponía.

La expresión del gen ICP en pMAM1 produce un ICP recombinante con 10 aminoácidos adicionales en el N-terminal (ICPr+10), mientras que en pMAM3 produce un ICP recombinante sin residuos adicionales (ICPr). Ambas formas se encuentran casi exclusivamente en el medio de cultivo. Su producción tiene lugar durante la fase exponencial del crecimiento de los cultivos de E. coli.

A continuación se ensayaron diversas cepas de E. coli, así como diferentes condiciones de cultivo para optimizar la producción de ICPr. Las cepas MC1061 y HB101 resultaron ser las más productivas, mientras que las TG1 y JM109 producen diez y tres veces menos ICPr, respectivamente. Respecto a las condiciones de cultivo, se ensayaron distintas fuentes de carbono (glicerol, glucosa, lactosa) a diferentes concentraciones, hallándose que la máxima producción de ICPr se obtenía a un 0,5% de glicerol (1,5 a 2,5 µg ICPr/ml de cultivo). La mejor temperatura para dicha producción son 37°C, y no hay diferencias significativas en la misma en cultivos inducidos con 0,2 a 2mM IPTG 0 a 4h después de iniciarse el cultivo.

4. Purificación del ICPr. Homogeneidad y caracterización del ICPr purificado

Se ha diseñado un protocolo para purificar el ICPr a partir de cultivos de E. coli diferente a los previamente descritos para la purificación de ICP natural a partir de patata (Hass et al., 1979; Pearce and Ryan, 1983).

Para dicha purificación se partió de un cultivo de 0,5 l de E. coli MC1061(pMAM3). Este se centrifugó y el sobrenadante se concentró usando cartuchos Sep-Pak C18. El material resultante se cromatografió en una columna TSK-DEAE usando un sistema de FPLC. Las fracciones con actividad inhibitora de carboxipeptidasa se concentraron usando de nuevo

un cartucho Sep-Pak y el material resultante se sometió a HPLC usando una columna C4 (fase inversa), eluyendo el ICPr en un solo pico homogéneo. En conjunto, se obtuvieron 0,5 mg de ICPr aparentemente homogéneo a partir de los 0,5 l de medio con un rendimiento del 52% y una purificación de 16 veces.

La pureza de la preparación final de ICPr se verificó sometiendo una muestra del mismo a HPLC usando una columna C4 analítica. Se obtuvo un solo pico, demostrándose que dicha preparación era pura.

Se determinó la K_i del ICPr de acuerdo con el método de Henderson (Henderson, 1972), que resultó ser de 1,8 nM; valor que está dentro del rango de K_i previamente descrito para el ICP-II salvaje (1,5 a 2,7 nM; Hass and Ryan, 1981). Asimismo se ha hallado la masa molecular del ICPr mediante espectrometría de masas, y ha resultado ser de 4295, exactamente igual a la masa molecular esperada a partir de la secuencia de aminoácidos del ICPr.

5. Producción del ICPr en fermentador

Actualmente se ha puesto a punto en nuestro laboratorio un sistema de producción del ICPr a gran escala mediante el uso de fermentador (LH serie 210 modelo direct drive sistem), obteniéndose una producción de 10 a 15 mg ICPr/l. Para su purificación se usa el protocolo descrito con el correspondiente escalado.

BIBLIOGRAFIA

- Ausubel, F.M. et al (1987) "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley and sons, New York
- Billings, P.C. et al. Carcinogenesis 10 (1989) 687
- Bullock, J. and Kristiansen, P. In "Basic Biotechnology" (1987). Academic, London.
- Ghrayeb, J. et al. EMBO J. 3 (1984) 2437
- Frank, R. et al. Methods in Enzimology, 154(1987):221-249
- Hass, G. H. et al. Plant Physiol 64 (1979) 1022
- Hass, G. H. and Ryan, C. A. Meth Enzimol 80 (1981) 778
- Henderson, P.J.F. Biochem. J. 127(1972) 321-333
- Maywald, F. et al (1988) Gene 68:357-369
- Messing, J. (1983). Meth Enzimol 101:20-78
- Nakamaye, K. L. and Eckstein, F. Nucl Acid Res 14 (1986) 9679
- Pearce, G. and Ryan, C. A. Analyt Biochem 130 (1983) 223
- Robson, B. and Garnier, J. "Introduction to Proteins and Protein Engineering". Elsevier.
- Sanger, F. et al. Proc Natl Acad Sci USA 74 (1977) 5463
- Sharp, P.M. et al. Nucleic Acid Res 16(1988):8207-8211 Maniatis, T. et al (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Second Edition. Cold Spring Harbor, New York.
- Taylor, J.W. et al (1985). Nucl Acids Res 13:8749-8785