

EXPRESION EN ESCHERICHIA COLI DE UN PEPTIDOPERTENECIENTE A LA PROTEINA VP1 DEL VIRUS DEL POLIO

Myriam Sánchez de Gómez* y Annette Elmlad**

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá

**KabiGen, Estocolmo, Suecia.

Keywords: Gene fusion, synthetic oligodeoxynucleotides, protein A, affinity purification.

RESUMEN

Una secuencia sintética de 49 pb codificante para un péptido de la cubierta del virus del Polio se clonó en el vector de fusión pEZZ8, basado en el gen de la proteína A del *Staphylococcus aureus*. La expresión se hizo en *Escherichia coli* y la proteína de fusión se recuperó en el sobrenadante. Se purificó mediante cromatografía de afinidad con IgG Sepharosa y se identificó por medio de electroforesis en presencia de SDS.

ABSTRACT

A 49 bp synthetic sequence encoding a peptide from the polio virus capsid was cloned into the fusion vector pEZZ8, based on the *Staphylococcus aureus* protein A. The expression was done in *Escherichia coli* and the fusion protein was recovered from the supernatant. The product was purified by affinity chromatography on IgG Sepharose and identified by SDS PAGE.

INTRODUCCION

El avance significativo en el conocimiento de las bases químicas de la antigenicidad de las proteínas y el hallazgo de que un péptido sintético relativamente pequeño puede inducir una respuesta inmune contra la correspondiente proteína completa, ha abierto la posibilidad de desarrollar vacunas sintéticas.

Una de las estrategias usadas con este propósito es la tecnología del DNA recombinante para la producción de proteínas virales en varios tipos de células, como bacterias, levaduras o células animales (1). Los avances recientes en la clonación del DNA y en las técnicas de secuenciación, han contribuido a hacer esta estrategia más promisoría en la obtención de vacunas antisubunidades.

El virus del polio existe como 3 serotipos estables, ninguno de los cuales puede ser neutralizado completamente por anticuerpos producidos contra los otros serotipos. Se han identificado cuatro proteínas virales de importancia antigénica

(VP1, VP2, VP3 y VP4), pero los estudios de inmunización hechos con estas proteínas purificadas han mostrado niveles bajos de anticuerpos neutralizantes, lo cual limita su carácter protector (2).

Aunque se desconoce la estructura de los epítopes responsables de la producción de anticuerpos neutralizantes, se sabe que ellos están localizados en las tres proteínas superficiales del virión (VP1, VP2 y VP3) y que el mayor número de ellos se concentra en VP1.

Baltimore y sus colaboradores han reportado la construcción de plásmidos en los que se ha insertado la secuencia completa de VP1 y ensayado su expresión en células animales. Parece sin embargo, que las proteínas virales de la cubierta son tóxicas para la célula hospedera y por esto se ha optado por la alternativa de emplear fragmentos inmunológicamente activos (1).

Uno de los mayores problemas que se encuentran al hacer la expresión de proteínas en *E. Coli*, es la degradación de las mismas por enzimas proteolíticas de la bacteria. Recientemente en KabiGen, Suecia (3) se desarrolló un sistema novedoso de fusión de genes, basado en el gen que codifica para la Proteína A del estafilococo (SpA) al cual se pueden fusionar secuencias de cDNA o genes sintéticos, con lo cual se ha logrado reducir la degradación del producto y a la vez facilitar su purificación.

Debido a su importancia como reactivo inmunológico se han hecho numerosos estudios bioquímicos y estructurales de la Proteína A. Inicialmente se aceptó que estaba compuesta por cuatro dominios enlazantes de IgG de aproximadamente 58 aminoácidos cada uno y designados A, B, C y D. El análisis de la secuencia del gen correspondiente reveló un quinto dominio (E) que corresponde a la región amino terminal de la Proteína A madura y que también enlaza IgG. Entre los cinco dominios existe una gran homología y las mayores divergencias en lo que a secuencia se refiere se encuentran en E. Todo el conjunto se encuentra precedido por una secuencia señal (S) de 36 residuos de aminoácidos y en la zona carboxilo terminal se localiza la región X, que realiza el anclaje de la proteína a la pared celular de la bacteria (3). En la Fig. 1 se ilustra esta situación y algunos vectores sintéticos derivados del mismo.

Las fusiones con la SpA se han usado en la inmovilización de enzimas, por ejemplo de la B-Galactosidasa (4) y en la obtención del Factor de Crecimiento I similar a la Insulina (IGF-I) (5) obteniéndose una hormona biológicamente activa. Se ha demostrado también que las proteínas de fusión se pueden utilizar en la producción de anticuerpos específicos contra el producto del gen fusionado con SpA (6).

Con el objeto de facilitar la clonación y expresión del producto de fusión, se han construido varios vectores basados en el gen SpA. Trabajando en la expresión de IGF-I, se encontraron los mejores rendimientos con un vector en el cual los dominios nativos de SpA se reemplazaron por uno sintético (Z) y la máxima secreción extracelular de la hormona se logró con la construcción que tenía dos dominios Z (7,8).

Con base en estos resultados se inició el presente trabajo con el propósito de producir por ingeniería genética, un péptido perteneciente a la proteína VP1 de la cubierta del virus del polio, y que previamente se había reportado como el de mayor significado antigénico (2). Usando el sistema de expresión/secreción mediante la fusión con el gen SpA, la proteína de fusión purificada puede tener uso potencial como vacuna contra el polio.

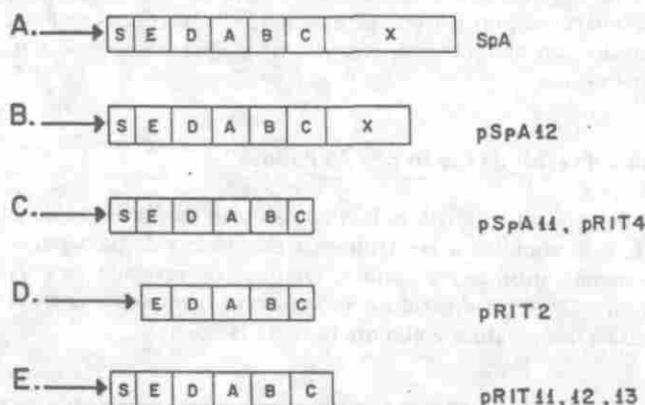


FIGURA 1. Representación lineal del gen de la proteína A (SpA) empleado en la construcción de algunos vectores. A corresponde al gen nativo. La flecha en cada caso representa el promotor.

MATERIALES Y METODOS

Bacterias:

Como célula hospedera se usó *Escherichia coli* HB101. La transformación de las bacterias se hizo de acuerdo con Morrison (9) y se hicieron crecer en medio LB (Bactotripton 16 g, Extracto de levadura 10 g y NaCl 5 g en 1 lt.).

Plásmidos:

Se usó el vector de fusión genética pEZZ8 (4610 pb) obtenido por Lowenadler (6) y que fue ensamblado a partir de las siguientes cuatro partes: 1- El vector pEMBL8 (10) de alto número de copia. 2 - Un fragmento genético que contenía el promotor y la secuencia señal de la SpA del estafilococo (3), 3 - Dos copias del fragmento sintético Z enlazante de IgG (8) y 4 - El fragmento "polylinker" del plásmido M13mp8.

Enzimas:

Las enzimas de restricción (New England Biolabs), T4 DNA ligasa (Pharmacia), Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) (Boehringer Mannheim), Polinucleótido kinasa (Pharmacia), se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Síntesis de Oligodesoxinucleótidos:

Se empleó el método con Fosfoamidita (11) utilizando un sintetizador automático. Los oligómeros se purificaron por medio de electroforesis en poliacrilamida. Para su clonación en el vector se fosforilaron en presencia de Kinasa y ATP a 37°C durante 45 min.

Construcción del vector de fusión pEZZ8 Polio:

El vector se digirió con las enzimas EcoRI y HindIII en presencia de CIP durante 1 h. a 37°C y se sometió a electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión (1%) conteniendo bromuro de etidio. Después de revelado se cortó la banda correspondiente al vector digerido y se ligó con los oligómeros en presencia de T4 DNA ligasa a temperatura ambiente durante la noche.

Células competentes de *E. coli* se transformaron por tratamiento con CaCl₂ (9) y se hicieron crecer en medio conteniendo ampicilina. El DNA plasmídico se extrajo por lisis alcalina y se purificó por ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (12).

Análisis de Secuenciación:

Para verificar la secuencia correcta del inserto se empleó el método del Dideoxinucleótido de Sanger (13) en presencia de CTP-S³⁵. Los productos se separaron por electroforesis en poliacrilamida y la posición de las bandas se reveló por autorradiografía.

Purificación de la Proteína de Fusión:

Las células de *E. coli* conteniendo el plásmido pEZZ8 Polio se hicieron crecer en medio con ampicilina. Las células se separaron por centrifugación y el sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad con IgG-Sepharosa (10 ml de gel), equilibrada con buffer TST (50 mM tris, 150 mM NaCl y 0.05% Tween 20) pH 7.6. La muestra se aplicó a una velocidad de 5 ml/min y se lavó con acetato de amonio 10 mM, pH 4.8 hasta fin de proteína. Se eluyó la proteína adsorbida con ácido acético 0.2 M pH 3.3.

La caracterización de la proteína se hizo por medio de electroforesis con SDS.

RESULTADOS

Construcción del Vector pEZZ8 - Polio:

Se sintetizaron los dos oligonucleótidos correspondientes a las dos cadenas de DNA (Poli1 yggA y Poli1 yggB) que codifican para el péptido de la proteína VP1, seleccionado como más antigénico. La secuencia correspondiente se muestra en la Fig. 2. Al final de la secuencia se insertó un codó de terminación (TAA) y a la izquierda y derecha del DNA se colocaron las secuencias codificantes para los sitios de restricción EcoRI y HindIII respectivamente, para un total de 49 pb. EcoRI y HindIII respectivamente, para un total de 49 pb.

Los oligonucleótidos fosforilados se ligaron al vector por los sitios de restricción antes mencionados. La Fig. 3 muestra la construcción resultante. Aproximadamente 2 ug (12 fmoles) del vector se ligaron con la mezcla de oligonucleótidos en proporciones 1:50 y 1:500 molar (vector: inserto). Después de transformadas las células se observó el desarrollo de colonias en medio con ampicilina.

Los cultivos conteniendo los dos transformantes (denominados P1 y P2) se hicieron crecer por triplicado y se procedió a extraer y purificar el DNA plasmídico. En la Tabla 1 se muestra la recuperación de DNA en cada una de las muestras.

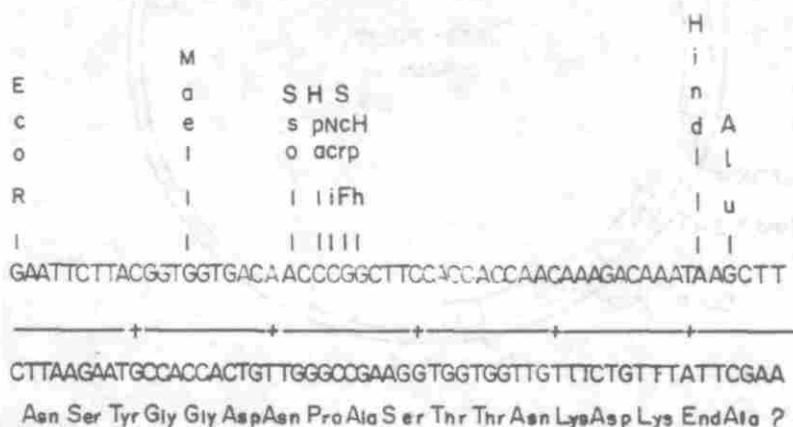


FIG. 2. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos Poli1 yggA y Poli1 yggB y los correspondientes aminoácidos codificados.

Tabla 1
RECUPERACION DE DNA PLASMIDICO DE LOS TRANSFORMANTES
1 Y 2

Transformante	DNA (ug totales) ^{a)}
P 11	196.8
P 12 ^{b)}	—
P 13	27.9
P 21	24.9
P 22	246.8
P 23	12.1

a) Valores obtenidos por lectura de Abs, a 260 nm.

b) Este replicado se perdió accidentalmente durante el proceso de purificación.

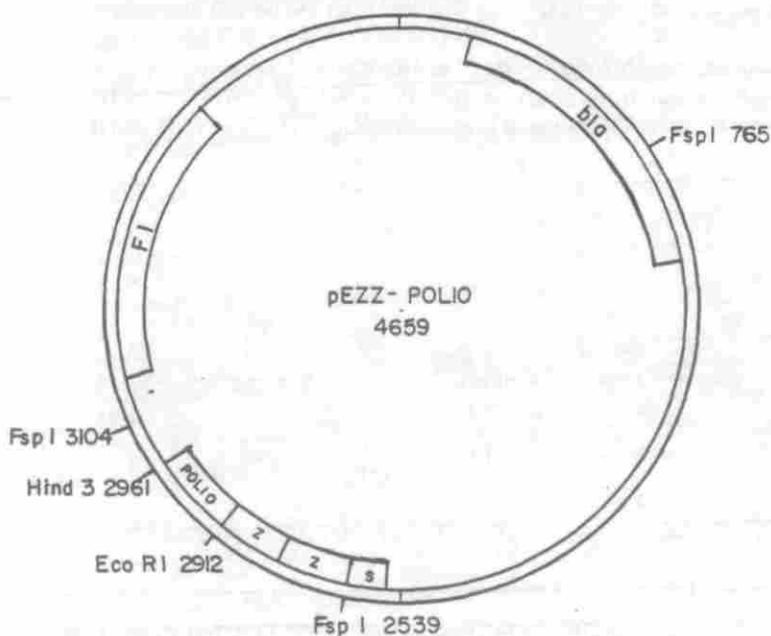


Fig. 3. Vector de fusión pEZZ-POLIO, bla corresponde al gen B - lactamasa F1 al gen de replicación del fago f1, S es la secuencia señal del gen SpA Z en un gen sintético.

Caracterización del Vector Recombinante:

La concentración de cada uno de los plásmidos se ajustó a 0,5 ug/ul con buffer Tris 0.1M y se verificó la toma del plásmido por las células por medio de diges-

ción del vector con la enzima FspI. Tal como se observa en la Fig. 3, esta enzima corta al vector en los sitios 765, 2539 y 3104 para dar los fragmentos de tamaño 1774, 565 y 2288. El resultado obtenido se observa en la Fig. 4, que corresponde a la electroforesis en agarosa de los plásmidos recombinantes (antes y después del tratamiento con FspI). Se puede apreciar la presencia de 3 fragmentos después de la digestión, el más pequeño contiene la secuencia sintética insertada (ZZ-Polio).

El resultado del análisis de secuenciación para los 5 plásmidos clonados se muestra en la Fig. 5. Los clones P13, P21 y P22 mostraron tener la secuencia correcta. El clon P11 mostró una delección de la base T en el sitio EcoRI de la secuencia y el clon P23 no pudo ser analizado por estar en muy baja cantidad.

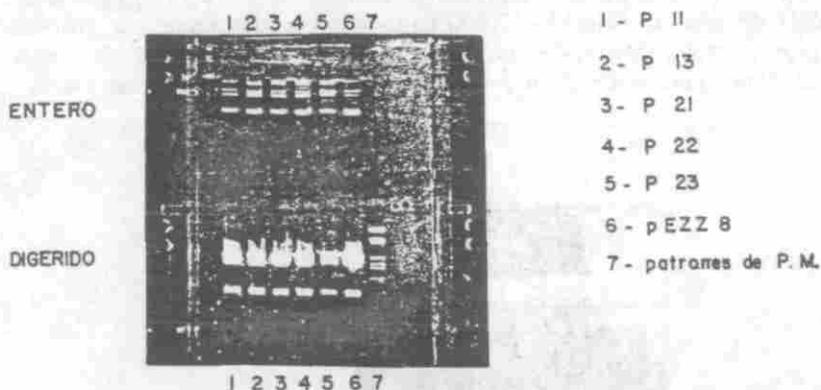


FIGURA 4. Electroforesis del plasmido recombinante pEZZ8 - POLIO

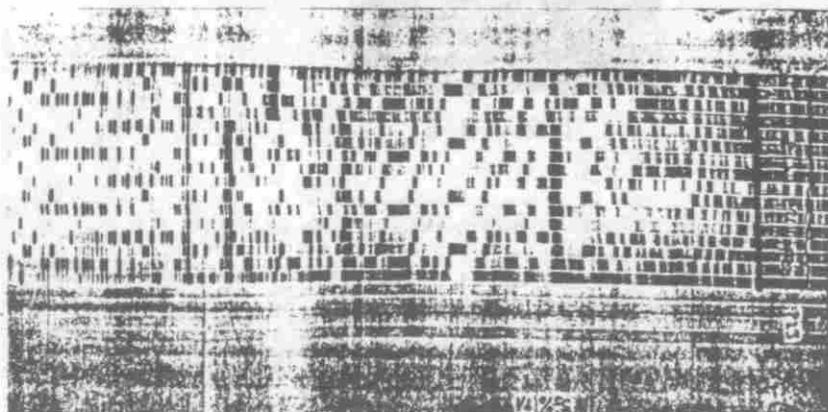


FIG. 5. Autoradiografía de la electroforesis de los productos del análisis de secuenciación de los plásmidos pEZZ-POLIO.

Análisis de la Proteína de Fusión:

La producción de la proteína de fusión (ZZ-Polio) se investigó por medio de cromatografía de afinidad empleando IgG Sepharosa. El sobrenadante obtenido después de la separación de las células se aplicó a la columna y se lavó con el buffer de equilibrio. En seguida se aplicó acetato de amonio pH 4.8 hasta fin de proteína y se eluyó el material adsorbido con ácido acético 0.2 M, pH 3.3 de acuerdo con (7).

El pico conteniendo la proteína de fusión se liofilizó y se realizó una electroforesis con SDS empleando un gel de separación de 20% de acrilamida. (Sistema PHAST - Pharmacia). Se usaron marcadores de peso molecular y una mezcla conteniendo las proteínas IGF-I, ZZ y ZZ-IGF-I. El gel resultante se muestra en la Fig. 6, donde se puede comprobar en los carriles 1, 2 y 3 la presencia de una banda de peso aproximado 17.000 daltons que corresponde a la proteína de fusión ZZ-Polio obtenida de los transformantes P13, P21 y P22. El tamaño de esta proteína está entre ZZ-IGF-I y ZZ tal como se observa en el carril 4.

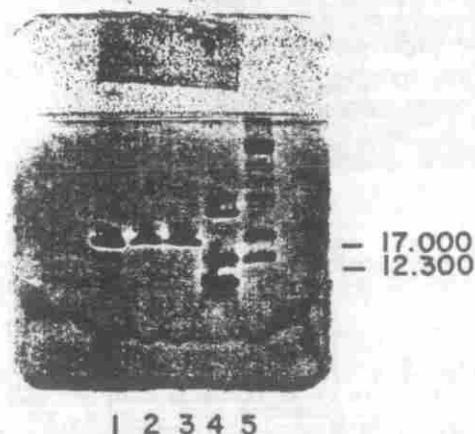


Fig. 6. Electroforesis de la proteína de fusión ZZ-POLLO

- 1 - Proveniente de P 13
- 2 - Proveniente de P 21
- 3 - Proveniente de P 22
- 4 - ZZ - IGF I, ZZ, IGF I
- 5 - Marcadores de P.M.

DISCUSION

Los sistemas de fusión genética constituyen un adelanto muy importante para la purificación de proteínas producidas en huéspedes como *E. coli* entre otros. La

combinación de secreción y purificación por afinidad, como es el caso del presente trabajo, ofrece enormes ventajas considerando que la bacteria contiene millares de proteínas intracelulares, alrededor de 100 proteínas periplásmicas y solo aproximadamente 10 se excretan al medio (7). Es de esperar por lo tanto, que se logre un alto grado de purificación cuando el producto del gen, está destinado para la exportación. Esto además, reduce las posibilidades de degradación de la proteína foránea por enzimas proteolíticas de la bacteria. El empleo de la proteína A del estafilococo hace que el procedimiento de purificación sea técnicamente muy simple, debido a su capacidad para combinarse con la porción Fc de la mayoría de las inmunoglobulinas.

El vector recombinante pEZZ8-Polio permitió la expresión y secreción de la proteína de fusión consistente de dos residuos ZZ seguidos por 16 aminoácidos, pertenecientes a la proteína VP1 de la cubierta del virus del polio. Esta construcción había sido probada en un trabajo previo, donde se logró producir la hormona IGF-1 biológicamente activa (8).

Los resultados alcanzados en el presente trabajo permiten afirmar que la proteína expresada y secretada por *E. coli* corresponde a la proteína de fusión ZZ-Polio. La secuencia escogida incluye los aminoácidos 93 a 103 de la proteína VP1, que según Emini y colaboradores (2) corresponde a la región más activa inmunogénicamente.

Está demostrado también que la proteína de fusión puede utilizarse en la producción de anticuerpos específicos (6), lo que muestra la importancia potencial de la proteína ZZ-Polio como vacuna contra la enfermedad producida por el virus del polio. Los ensayos correspondientes están siendo adelantados por los Laboratorios Bacteriológicos del Estado (SBL) en Estocolmo, Suecia.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Internacional en Ciencias Químicas (IPICS) de la Universidad de Uppsala, Suecia, al Departamento de Química de la Universidad Nacional y al Instituto KabiGen, Estocolmo, Suecia, entidades que hicieron posible la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, R. *TIBS* 1986. 11, 521.
2. EMINI, E.A., B.A. JAMESON and E. WIMMER, *Nature*. 1983. 304, 699.
3. NILSSON, B. "Fusions to the Staphylococcal protein A", Thesis, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, pp. 5-34, 1986.
4. NILSSON, B. L. ABRAHMSSEN and M. UHLEN, *EMBO J.* 1985. 4, 1075.
5. NILSSON, B. E. HOLMGREN, S. JOSEPHSON, S. GATENBECK, L. PHILIPSON and M. UHLEN, *Nucl. Acids, Res.* 1985. 13, 1151.

6. LÖWENADLER, B. B. JANSSON, S. PALEUS, E. HOLMGREN, B. NILSSON, T. MOKS, G. PALM, S. JOSEPHSON, L. PHILIPSON and M. UHLEN, *Gene*, 1987, 58, 87.
7. MOKS, T. L. ABRAHMSSEN, E. HOLMGREN, M. BILICH, A. OLSSON, M. UHLEN, G. POHL, C. STERKY, H. HULTBERG, S. JOSEPHSON, A. HOLMGREN, H. JORN-VALL and B. NILSSON, *Biochemistry*, 1987, 26, 5239.
8. NILSSON, B., T. MOKS, B. JANSSON, L. ABRAHMSSEN, A. ELMBLAD, E. HOLMGREN, C. HENDRICHSON, T.A. JONES and M. UHLEN, *Protein. Engineering*, 1987, 1, 107.
9. MORRISON, D.A. *Methods in Enzymology*, 1979, 68, 326.
10. DENTE, L., C. CILIBERTO and R. CORTESE, *Nucl. Acids Res.* 1985, 23, 3941.
11. ELMBLAD, A., S. JOSEPHSON and G. PALM, *Nucl. Acids Res.* 1982, 10, 3291.
12. MANIATIS, T., E.F. FRITSCH and S. SAMBROOK, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
13. SANGER, F., S. NICLEN and A.R. COULSON, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1977, USA, 74, 5463.