

EXPRESIÓN COMO PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE LAS SUBUNIDADES PB1 Y PB2 DE LA POLIMERASA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

M. Ochoa (1), S. de Luna (2), M. E. Pacheco (3), A. Nieto (2), J. Sanz (2), J. A. Melero (4), J. Ortín (2), A. Portela (4). (1) Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Ciudad Universitaria. Caracas 1040, Venezuela. FAX N° (2) 6053327. (2) Centro Nacional de Biotecnología (CSCI). Universidad Autónoma. Cantoblanco 28049. Madrid, España. (3) Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Ciudad Universitaria. Caracas 1040, Venezuela. (4) Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus. Majadahonda 28220. Madrid, España.

RESUMEN

Los cADNs de los genes que codifican las proteínas PB1 y PB2 de la ARN polimerasa del virus de la influenza, se clonaron en fase en un sitio distal del ATG que codifica la proteína 10 del bacteriófago T7, en el vector de expresión pAR3040, bajo el control de un promotor de la ARN polimerasa de T7. Los plásmidos recombinantes se introdujeron en la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, que contiene en su genoma el gen de la ARN polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor (*lac uv5*) inducible por IPTG. La inducción de la ARN polimerasa del fago T7 en las células hospederas, resultó en la expresión de las proteínas PB1 y PB2 en forma de proteínas de fusión. Las proteínas expresadas se acumularon en grandes cantidades en el interior de las células bacterianas y fueron recuperadas de los lisados en forma de precipitados insolubles.

Palabras claves: expresión de proteínas/vector de expresión/T7 ARN polimerasa/ADN recombinante.

ABSTRACT

cDNAs genes coding for influenza virus RNA polymerase PB1 proteins, were fused in frame after the 11th codon of the T7 bacteriophage major capsid protein, on the overexpression vector pAR3040, under the control of T7 RNA polymerase promoter. Recombinant plasmids were transferred to *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS which has in its genome phage T7 RNA polymerase gene, under *lac uv5* promoter, inducible by IPTG. Induction of the T7 RNA polymerase in host cells resulted in extensive overproduction of PB1 and PB2 polypeptides as fusion proteins. The overproduced material was recovered from cell lysates as insoluble precipitates.

(protein overproduction/expression vector/T7 RNA polymerase/recombinant DNA).

*Autor al que se dirigirán correspondencia y solicitud de separatas.

INTRODUCCIÓN

El genoma de los virus de la influenza de los tipos A y B está formado por ocho segmentos genéticos de ARN, de banda simple y de polaridad negativa, que codifican al menos diez proteínas virales⁽¹⁾. Los procesos de replicación y transcripción de estos virus comprenden una serie de reacciones enzimáticas complejas, que son catalizadas por la ARN polimerasa asociada al virión^(2,3,4,5). Esta polimerasa está constituida por tres subunidades polipeptídicas denominadas PB1 (86Kd), PB2 (82Kd) y PA (84Kd), o complejo de proteínas P, las cuales son codificadas por los segmentos genéticos de mayor tamaño del virus y presentan como característica particular, la de asociarse entre sí formando complejos^(6,7,8,9). En la partícula viral las tres proteínas P y la nucleoproteína (NP) se asocian al ARN viral formando complejos de ribonucleoproteínas (RNPs), los cuales constituyen los moldes funcionales para la replicación y transcripción del genoma viral⁽⁵⁾.

Aunque durante la década pasada se ha acumulado una información extensiva mediante análisis bioquímicos y genéticos respecto a las funciones de algunas de las subunidades que constituyen el complejo de proteínas P^(3,10,11,12), poco se sabe acerca de las relaciones estructura-función de cada una de estas proteínas dentro del complejo de transcripción y replicación. En este sentido, los antisueros y anticuerpos monoclonales han demostrado ser reactivos de gran utilidad, en general, para el estudio de las proteínas, ya que con ellos se han podido derivar por ejemplo, características antigénicas y funcionales particulares. Sin embargo, una de las principales limitaciones encontradas al intentar preparar antisueros y anticuerpos monoclonales contra cada una de las subunidades de la polimerasa viral, ha sido el hecho de que dichas proteínas se encuentran en muy pequeña cantidad tanto en viriones como en células infectadas^(13,14).

A objeto de obtener suficiente cantidad de estas proteínas, para su posterior utilización como inmu-

nógenos, hemos construido plásmidos recombinantes que permitan la expresión en forma de proteínas de fusión, de las subunidades PB1 y PB2 de la polimerasa del virus de la influenza. El sistema elegido para la expresión, basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7⁽¹⁵⁾, nos había permitido previamente la expresión adecuada y su uso posterior como inmunógenos, de la proteína PA completa y de un fragmento de 402 aminoácidos del extremo amino-terminal de la proteína PB2^(16,17).

MÉTODOS

Plásmidos y cepas bacterianas. La fuente de los genes de PB1 y PB2 fueron los plásmidos pARB1-12(18) y pUK-PB2 (cedido por J. Sanz) respectivamente. Estos plásmidos se obtuvieron en la cepa bacteriana *E. coli* DH5 y contienen una copia de cADN del gen completo que codifica por las proteínas PB1 (segmento 2) y PB2 (segmento 1), de la cepa A/Victoria/3/75.

El recombinante pARB1-B1, se obtuvo por modificación por PCR del plásmido PARB1-12 y posterior subclonaje del producto de la amplificación en el sitio de restricción Bam HI del vector de expresión PAR-3040⁽¹⁹⁾. La estructura del plásmido pAR3040 se muestra en la figura 1 y, como puede observarse, presenta los siguientes elementos de control: a) El promotor ϕ 10 que precede al gen 10 del bacteriófago T7 (I). b) La secuencia Shine-Delgarno que precede en 8 nucleótidos al codón de iniciación del gen 10 del bacteriófago T7 (SD). Los 15 primeros codones del gen 10, que codifican por la proteína mayoritaria de la cápsida del bacteriófago y que incluye una diana de restricción para la enzima Bam HI (III). d) El terminador de la transcripción T ϕ (*), que actúa como un eficiente terminador de la transcripción para la T7 ARN polimerasa y e) El gen que confiere resistencia a la ampicilina (ApR). El recombinante pARB2-A1 se obtuvo por subclonaje del gen de PB2 en el sitio de restricción Bam HI del mismo vector.

La expresión de los genes de PB1 y PB2 se realizó en un sistema basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7, utilizando los recombinantes derivados del plásmido pAR3040, en la cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS⁽²⁰⁾. Esta cepa bacteriana está específicamente optimizada para la expresión de proteínas tóxicas.

Manipulación de ácidos nucleicos. El método utilizado para la preparación del ADN plasmídico fue el de la lisis alcalina⁽²¹⁾. Las digestiones con endonucleasas de restricción, tratamientos con ADN polimerasa I fragmento Klenow, ADN ligasa del bacteriófago T4 y fosfatasa alcalina, así como la desproteinización y concentración de ácidos nucleicos, se hicieron si-

guiendo los protocolos estándares descritos anteriormente⁽²²⁾. Para la elución de los fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión se utilizó el estuche comercial GENE CLEAN II (Bio 101).

i) **Secuenciación de ADN.** Para la secuenciación del ADN plasmídico se siguió el método de los terminadores específicos de cadena⁽²³⁾. Para ello, se empleó el estuche comercial SEQUENASE VERSIÓN 2.0 (USB), que utiliza [α^{35} S]ATP y la enzima ADN polimerasa del bacteriófago T7 (Sequenasa), siguiendo las instrucciones del suministrador. Los productos de reacción se separaron en geles desnaturizantes de acrilamida-bisacrilamida del 6%, conteniendo urea 7M y se expusieron para autorradigrafía.

ii) **Amplificación in vitro del gen de PB1 a partir del plásmido pARB1-12.** Para la amplificación in vitro de las secuencias codificantes del gen de PB1 se utilizaron los oligonucleótidos 5' PB1ATGL (5' GGAATTCGGATCCAATGGATGTCAATCCGACTT TA 3') y 3' PB1UAAL (5'GCTACGGGATCCATATGG ACAAGCTTAAATTCATTA3'), los cuales incluyen una diana de restricción para la enzima Bam HI (subrayado). Se tomaron 10 - 20 ngr del ADN plasmídico pARB1-12 linearizado y se amplificaron en un volumen de 100 μ l conteniendo Tris-HCl (pH 8) 10 mM, 50 μ M de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato, 0,25 mM de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 1.5 Unidades de Taq ADN polimerasa. Las reacciones se sometieron a 20 ciclos de desnaturización del ADN a 93°C durante 45 segundos, hibridación con el iniciador a 37°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 20 minutos. Se empleó un ciclo extra de polimerización durante 20 minutos. Para la amplificación se utilizó un termociclador automatizado (DNA THERMAL CYCLER de Perkin Elmer Cetus). El producto amplificado se concentró utilizando filtros Centricon 30, se extrajo con fenol, se recogió por precipitación con etanol y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa del 0,7%.

Transformación de bacterias e identificación y caracterización de los plásmidos obtenidos. Para la preparación de bacterias DH5 competentes y su posterior transformación con plásmidos, se utilizó el método del Cloruro de Rubidio⁽²⁴⁾. La preparación de las bacterias BL21 (DE3)pLysS competentes se hizo siguiendo protocolo descrito previamente⁽²⁰⁾.

i) **Transformación de ADN de colonias bacterianas.** El método seguido se basó en el procedimiento descrito por Grunstein y Hogness en 1975⁽²⁵⁾. Brevemente, se colocó un filtro de nitrocelulosa encima de la placa de cultivo y éste se levantó después de aproximadamente 5 minutos. Las bacterias

adheridas al filtro se lisaron por tratamiento con NaOH 0,5 M durante 10 minutos, se neutralizaron con Tris-HCl (pH 7,5) durante 10 minutos y se incubaron con una solución Tris-HCl pH (7,5) - NaCl 2M. El ADN se fijó al filtro por calentamiento a 80°C durante 2 horas en una estufa de vacío.

ii) **Identificación de bacterias que portan el plásmido recombinante de interés.** La identificación se llevó a cabo por hibridación con sondas específicas por cada gen, marcadas radiactivamente. Los oligonucleótidos sintéticos se marcaron con [γ^{32} P] ATP y polinucleótido kinasa del bacteriófago T4. La mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl pH (7,5) - $MgCl_2$ 10mM - DTT 5 mM, 40 mCi de [γ^{32} P]ATP, 30 ngr del oligonucleótido y 1 unidad de polinucleótido kinasa, se incubó a 37°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo por calentamiento a 60°C durante 5 minutos.

Los filtros que contenían el ADN de las bacterias, se incubaron en una solución de hibridación (5x Denhardt, 6x SSC - SDS 0,2% y 1 mgr de esperma de salmón) a 42°C durante 2 horas. Los filtros se hibridaron en la misma solución con la sonda marcada a 42°C durante 16 horas. El material no unido se eliminó por 3 lavados sucesivos con la solución de hibridación y los filtros se secaron y expusieron para autorradiografía.

Expresión y análisis de las proteínas recombinantes. Los experimentos se realizaron según protocolo descrito anteriormente⁽²⁰⁾. Las bacterias se cultivaron en medio M9 con 50 μ gr/ml de ampicilina y 25 μ gr/ml de cloranfenicol a 37°C en agitación, hasta obtener una $DO_{600} = 0,6$. En este punto, se indujo la expresión de la proteína recombinante por la adición de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) 4 mM al medio de cultivo. Tras incubación 30 minutos a 37°C, se añadieron 100 mgr de rifampicina al cultivo, a objeto de inactivar la ARN polimerasa bacteriana, continuándose la incubación durante 90 minutos más. Finalizado el período de la inducción, las células se centrifugaron a 7.000 rpm en centrífuga Sorvall/rotor GSA durante 10 minutos a 4°C, resuspendiéndose el sedimento en el tampón A [Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM - NaCl 100 mM - EDTA 1 mM y 0,5% de glicerol] (1% del volumen original del cultivo inducido). El lisado celular se congeló y descongeló por tres veces consecutivas y se centrifugó a 12.000 rpm en centrífuga Sorvall/rotor SS-34, durante 10 minutos a 4°C. El sedimento insoluble se resuspendió en un volumen de tampón B (tampón A con 0,1% de deoxicolato sódico) y se trató con DNasa I (10 μ gr/ul) en presencia de $MgCl_2$ 10mM, durante 30 minutos a 4°C. Se repitieron dos pasos de centrifugación adicionales, en iguales condiciones a las anteriores, pero resuspendiéndose esta vez el sedimento insoluble en un volumen de

tampón D (tampón B con NaCl 0,5M). Las proteínas presentes en los lavados y en el sedimento insolubles se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 7,5% - SDS 0,1%⁽²⁶⁾ y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie.

Las proteínas inducidas también se analizaron por marcaje con [^{35} S]-metionina. En este caso, después de los 90 minutos de incubación con IPTG, se tomaron 25 μ l del cultivo inducido que se incubaron durante 5 minutos a 37°C con 5 μ Ci de [^{35} S]-metionina. A continuación, las bacterias se sedimentaron y se fraccionaron sus componentes tal y como se describe en el párrafo anterior.

RESULTADOS

Clonaje de los genes que codifican por las proteínas PB1 y PB2 en el plásmido pAR3040. Se pretendía subclonar los genes que codifican por las proteínas PB1 y PB2 del virus de la influenza A/Victoria/3/75 en el sitio de restricción Bam HI del vector pAR3040. Este sitio coincide con la secuencia que codifica por los aminoácidos 13 y 14 del gen 10 del bacteriófago T7⁽¹⁹⁾.

La estrategia seguida para la construcción del recombinante de PB1 (figura 2) consistió en amplificar mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) la secuencia codificante del gen de PB1, a partir del plásmido pARB1-12⁽¹⁸⁾. En la reacción de amplificación se utilizaron oligonucleótidos sintéticos que contenían, además de las secuencias específicas para el gen, dianas para la enzima de restricción Bam HI, que no digiere internamente en la secuencia de nucleótidos del gen de PB1. Tras la reacción de PCR, el ADN amplificado se trató con ADN polimerasa fragmento Klenow, se dirigió con la enzima de restricción Bam HI y posteriormente, se aisló de una agarosa de bajo punto de fusión del 0,7%. El producto aislado se ligó con T4 ADN ligasa al vector pAR3040, previamente digerido con la enzima Bam HI y desfosforilado por tratamiento con fosfatasa alcalina.

Para la obtención del recombinante de PB2 (figura 3), se utilizó el plásmido PUKPB2, en el cual la secuencia codificante de PB2 se encontraba flanqueada por dianas de restricción para la enzima Bam HI, que eran únicas en el plásmido. El ADN plasmídico se dirigió con Bam HI, se aisló la banda correspondiente al gen, a partir de una agarosa de bajo punto de fusión y se clonó en el sitio Bam HI del vector pAR3040. Con ambos plásmidos se transformaron bacterias *E. coli* DH5 competentes y la identificación de las bacterias recombinantes se llevó a cabo por hibridación *in situ*, con sondas radiactivas específicas para cada gen⁽²⁵⁾. Los plásmidos recombinantes que contenían el gen viral se anali-

zaron por restricción, a fin de determinar la orientación del inserto en el vector (resultados no mostrados). Los recombinantes obtenidos; pARB1-B1 y pARB2-A1, los cuales contenían los genes correspondientes a las proteínas PB1 y PB2 respectivamente, orientados correctamente en el vector (figura 4A), se analizaron por secuencia de la región próxima al promotor de la T7 ARN polimerasa⁽²³⁾ (figura 4B). Los ATG iniciadores que codifican por las proteínas PB1 y PB2, quedaron clonados en fase a continuación del onceavo codón que codifica por la proteína del gen 10 del bacteriófago T7.

Con esta estrategia se esperaba que los polipéptidos traducidos a partir de los ARNm, contuvieran una corta secuencia extra de aminoácidos en el extremo amino-terminal, correspondiente a la proteína 10 del bacteriófago T7.

Análisis de la expresión de las proteínas PB1 y PB2 en *E. coli*. A objeto de obtener suficiente cantidad de los polipéptidos PB1 y PB2 para su empleo posterior, se expresaron los genes clonados, en un sistema de expresión procariótico basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7⁽¹⁵⁾. En este sistema la fuente de la ARN polimerasa es una copia única del gen 1 de dicho bacteriófago, clonada bajo el control del promotor *lac uv5* (inducible por IPTG y que está integrada en el cromosoma de la cepa bacteriana BL21 (DE3)pLysS). Esta cepa contiene además, un plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol y que expresa en forma constitutiva la lisozima del fago T7. Esta enzima actúa como un inhibidor de la T7 ARN polimerasa bacteriana⁽²⁷⁾, lo cual permite que, en condiciones de no inducción, la cepa bacteriana exhiba niveles basales bajos de la enzima, favoreciendo la tolerancia a genes clonados cuyos productos resultasen tóxicos. Los plásmidos pARB1-B1 y pARB2-A1, se introdujeron en bacteria *E. coli* BL21(DE3)pLysS competentes. Los cultivos bacterianos transformados se crecieron e incubaron con IPTG, que induce la síntesis de la T7 ARN polimerasa, ésta a su vez reconoce su promotor y genera los transcritos de los genes a expresar.

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie, del extracto bacteriano transformado con el recombinante pARB2-A1, inducido con IPTG, reveló la presencia de dos bandas, que no estaban presentes en el cultivo control transformado con el plásmido pAR3040 (indicadas con una flecha; comparar canales 1 y 2 de la figura 5A). La banda de mayor tamaño posee la movilidad esperada para la proteína PB2 completa, mientras que la de menor tamaño puede corresponder a un producto de iniciación interno o a un producto de degradación de la proteína. El análisis de los lisados de estas bacterias, por centrifugación y lavado de los correspondientes sedimentos con

diferentes tampones, reveló que tales bandas siempre aparecían en el sedimento correspondiente (canales 3 y 4) y que no se solubilizaban por el tratamiento con una solución que contiene 0,1% de deoxicolato sódico y NaCl 0,5 M (canal 5). En el caso de las bacterias transformadas con el recombinante pARB1-B1 (figura 6A), no se observó en extractos totales del cultivo inducido, la aparición de una nueva banda (comparar canales 1 y 2). Sin embargo, sí se observó que en estas bacterias y no en las bacterias transformadas con el plásmido pAR3040, se acumulaba un polipéptido insoluble que tenía la movilidad electroforética esperada para la proteína PB1 completa.

Análisis de las proteínas inducidas por marcaje con [³⁵S]-metionina. Para confirmar que los polipéptidos sintetizados correspondían a un producto de la transcripción de los genes de PB1 y PB2 por la ARN polimerasa del fago T7, se analizaron los productos sintetizados por las bacterias durante un pulso con [³⁵S]-metionina. Los cultivos bacterianos se indujeron con IPTG, 30 minutos después de la inducción se añadió rifampicina y se continuó la incubación. A los 90 minutos se dio un pulso con [³⁵S]-metionina durante 5 minutos. La rifampicina es una droga que inhibe la ARN polimerasa bacteriana, pero no la ARN polimerasa del fago T7, con lo cual, se esperaba que a los 90 minutos después de la adición de esta droga no quedaran ARNm bacterianos y, por tanto, la marca que se observara vendría de los transcritos generados por la ARN polimerasa de T7. Como se observa en las figuras 5B y 6B, no se marcó ninguna proteína en bacterias transformadas con el plásmido pAR3040, mientras que sí se observaron bandas en los cultivos transformados con los plásmidos recombinantes. Dichas bandas, además, se correspondían por tamaño con las que se habían observado en los sedimentos insolubles de los geles teñidos con azul de Coomassie. Por tanto, se concluye que las bandas observadas se derivaban de los transcritos de los genes clonados. En el caso del recombinante pARB2-A1, también se observó la aparición de una banda de menor tamaño (señalada con una flecha), que quizás pueda corresponder a un producto de iniciación interno o a un producto de degradación de la proteína. Esta proteína también asumió el mismo comportamiento que la proteína de mayor tamaño durante el proceso de lisados y centrifugaciones en los diferentes tampones utilizados.

DISCUSIÓN

Una de las principales limitaciones encontradas en el estudio de las características y funciones de las subunidades de la polimerasa viral, ha sido la de

no disponer de suficiente cantidad de cada una de estas proteínas. Es por este motivo, que en este estudio se aborda la expresión de las subunidades PB1 y PB2. El sistema seleccionado fue el sistema de expresión procariótico descrito por Studier y Moffat en 1986⁽¹⁵⁾, el cual se basa en el uso de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Con este sistema se ha descrito la expresión de diversas proteínas, tanto de origen procariótico como eucariótico^(16, 28, 29, 30, 31).

Estudios previos, utilizando plásmidos recombinantes derivados del pAR3040, que contenían clonados los genes completos que codifican por las proteínas PB1 y PB2, de la cepa A/Victoria/3/75, habían demostrado no ser efectivos en la producción de proteínas recombinantes en este mismo sistema⁽¹⁸⁾. Este hallazgo sugiere que, cuando se intenta expresar proteínas, a pesar de que el gen se haya clonado bajo un promotor fuerte, este hecho no necesariamente garantiza su expresión. La ausencia de expresión cuando se utilizaron estos plásmidos podía deberse a varios factores, entre los cuales podemos mencionar: a) Una baja eficiencia durante el paso de inicio de la traducción⁽³²⁾, b) Una elevada degradación de la proteína en *E. coli*, o c) Un efecto tóxico de la proteína, lo que podría resultar en una pérdida del plásmido por el cultivo bacteriano, originando una reducción de la cantidad de proteína recombinante producida.

Como una alternativa para resolver el problema de la ausencia de expresión con estos plásmidos, se decidió preparar recombinantes que expresaran las proteínas virales PB1 y PB2 como proteínas de fusión. De esta forma, se construyeron dos plásmidos recombinantes en los cuales, la secuencia de nucleótidos que codifica por la correspondiente proteína viral (PB1 o PB2), se fusionó en fase a un sitio distal del codón iniciador del gen 10 del bacteriófago T7, presente en el vector de clonaje (y que corresponde al primer codón transcrito por la T7 ARN polimerasa). Así las señales de inicio de la traducción que se utilizarían, serían las correspondientes al gen 10, las cuales están adaptadas para una eficiente traducción y además, poseen el espaciamiento

adecuado entre la secuencia Shine-Dalgarno y el ATG iniciador de la proteína.

La expresión de proteínas heterólogas, como proteínas de fusión, ha demostrado poseer un número de ventajas en relación a la expresión de proteínas completas que carecen de secuencias extras de aminoácidos⁽³⁷⁾, entre las cuales podemos mencionar: a) Un aumento en la acumulación de la secuencia proteica deseada, lo que a su vez se traduce en un aumento de la disponibilidad de proteína a purificar y b) Un facilitamiento en la detección y purificación de la proteína en cuestión. Otra ventaja adicional de esta estrategia, podría ser que las proteínas de fusión producidas fueran más estables por contener una secuencia de aminoácidos de una proteína que se expresa en forma natural en *E. coli* y también, podrían resultar menos tóxicas por contener secuencias de aminoácidos foráneos.

Los plásmidos diseñados (pARB1-B1 y pARB2-A1) resultaron adecuados para la expresión de las proteínas respectivas. Tal como se muestra en el apartado de análisis y expresión de las proteínas PB1 y PB2 en *E. coli*, las bacterias inducidas transformadas con dichos plásmidos, expresaron proteínas con el peso molecular esperado y estas proteínas se acumularon en grandes cantidades en las bacterias (3 µg/µl de cultivo).

Un hallazgo significativo que también ha sido demostrado previamente para una variedad de productos proteicos de diverso origen^(34, 35, 36, 37), resultó ser, el que en ambos casos, las proteínas que se acumulaban en *E. coli*, lo hacían en forma de un precipitado insoluble dentro de la célula bacteriana, como puede observarse en las figuras 5 y 6 partes A y B. Este comportamiento repercute probablemente en el elevado rendimiento obtenido, ya que se ha descrito que las proteasas intracelulares no degradan las proteínas que se encuentran formando agregados⁽³⁸⁾.

En conclusión, las proteínas recombinantes preparadas ofrecen una fuente adecuada de reactivos que pueden ser de utilidad como inmunógenos, en la preparación de antisueros y anticuerpos monoclonales.

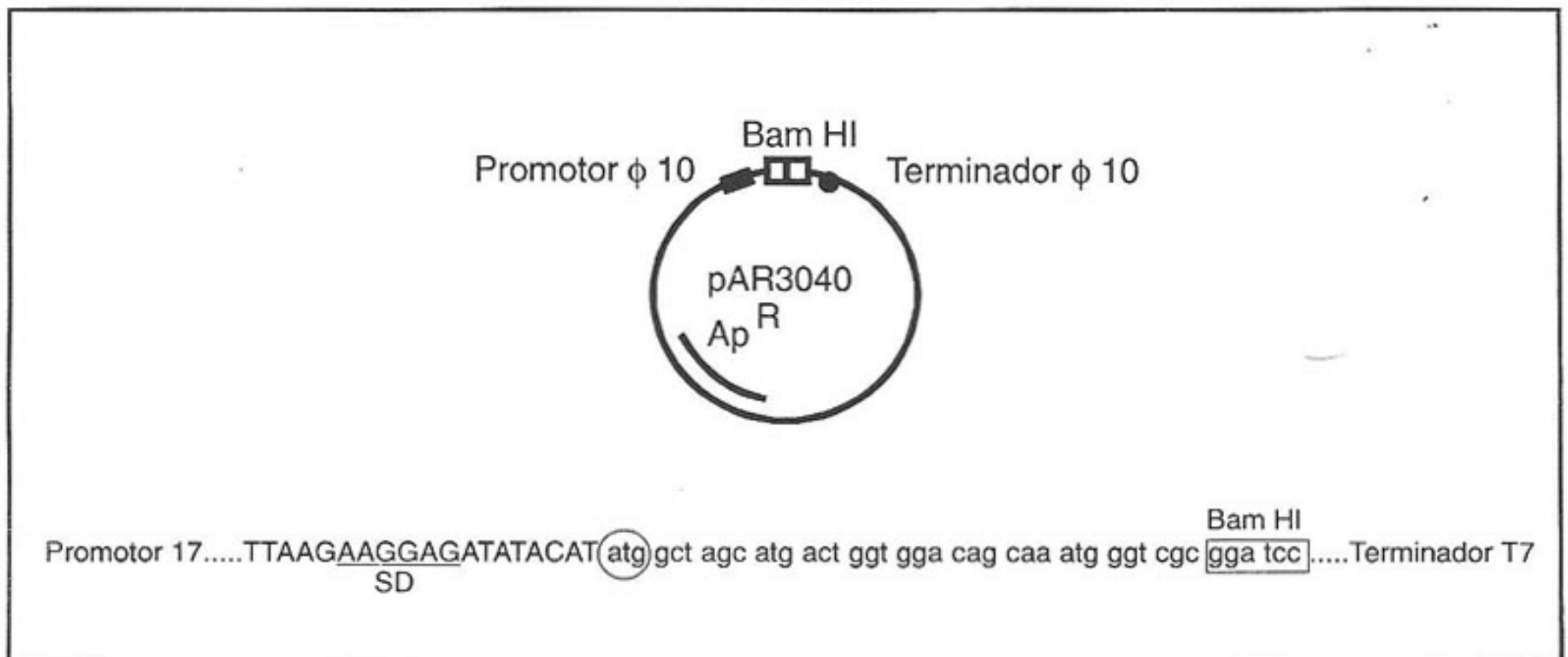
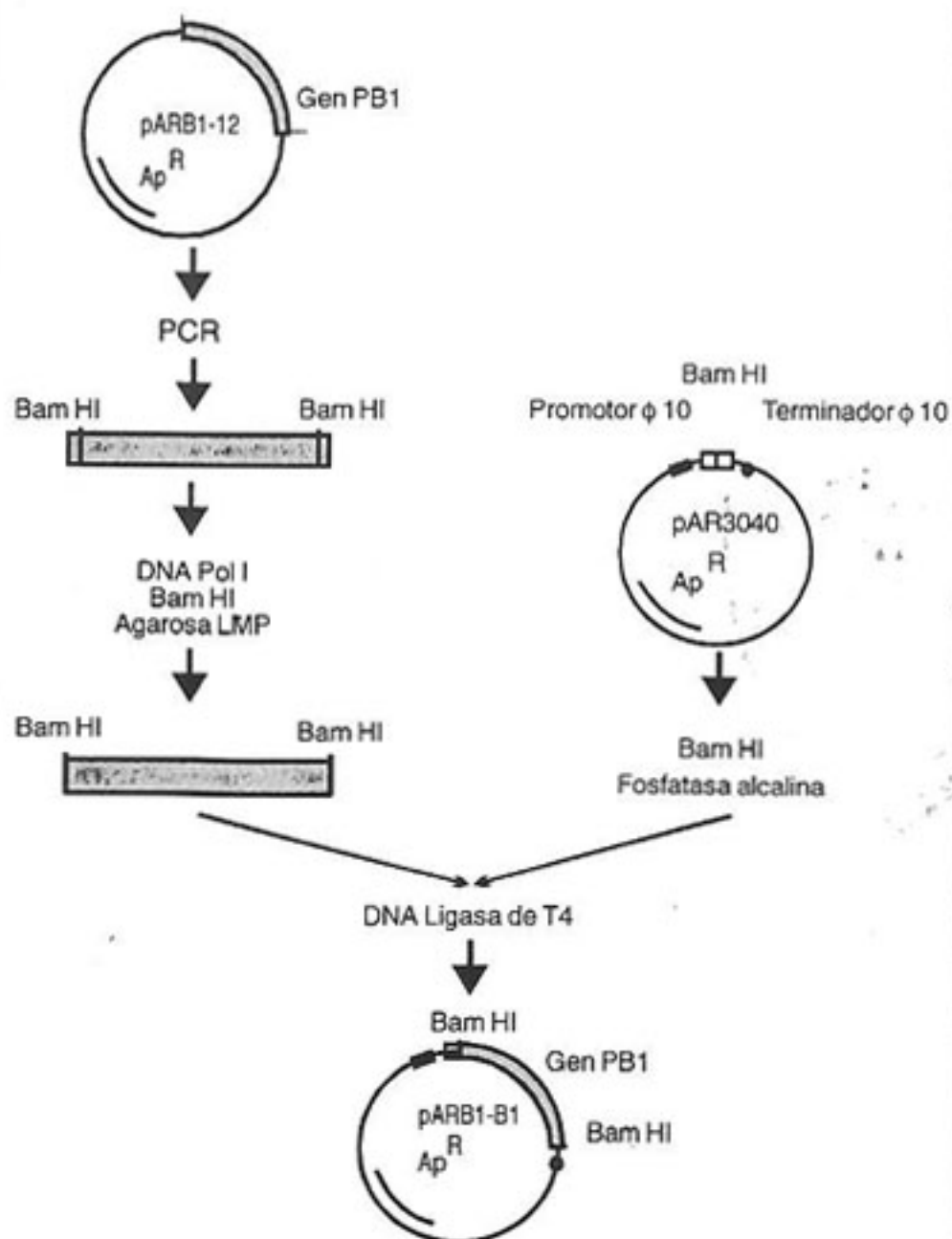
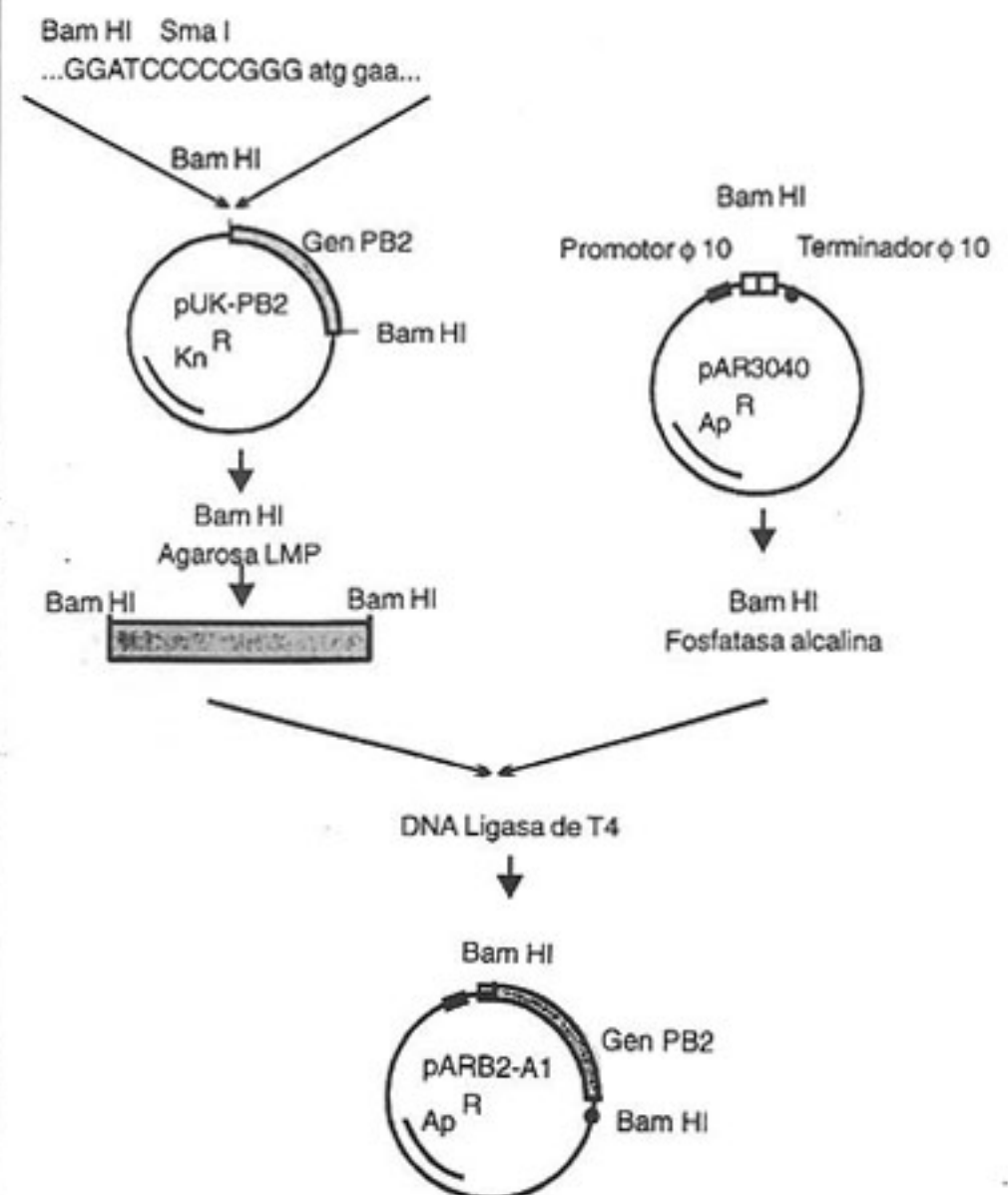
Figura 1. Estructura del plásmido pAR3040⁽¹⁹⁾ (ver detalles en texto).**Figura 2.** Esquema de construcción del plásmido pARB1-B1. Los símbolos son los mismos indicados en la figura 1. Los detalles se describen en MATERIALES Y MÉTODOS.**Figura 3.** Esquema seguido para la construcción del plásmido pARB2-A1. Los símbolos utilizados son los mismos de la figura 1. Los detalles se describen en MATERIALES Y MÉTODOS.

Figura 4. A) Esquema de la estructura de los plásmidos pARB2-A1 y pARB1-B1. Se indica la longitud en aminoácidos predichos para las dos proteínas de fusión (AA). B) Secuencia de nucleótidos en el sitio de iniciación de la proteína en los plásmidos pAR3040, pARB2-A1 y pARB1-B1. Los codones de iniciación de la proteína mayoritaria de la cápsida del bacteriófago T7 (gen 10) y las proteínas PB2 y PB1 están encerradas en un círculo. Se indican en letras las secuencias que codifican por la proteína 10 del bacteriófago T7. La secuencia Shine-Dalgarno se encuentra subrayada (SD).

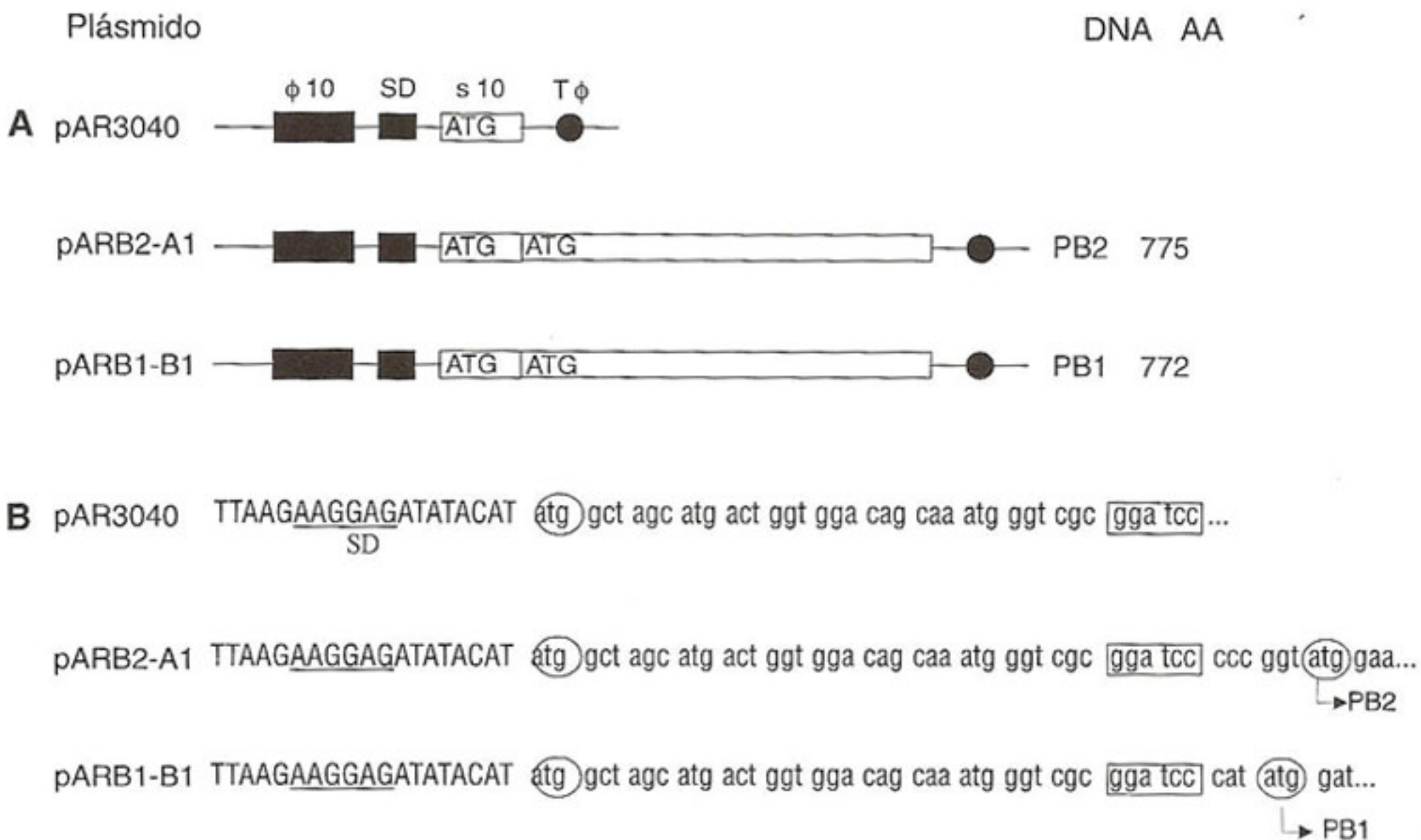


Figura 5. Análisis de las proteínas inducidas en bacterias *E. coli* BL21 (DE3)pLysS que transportan el plásmido pARB2-A1 por electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS. A) Gel teñido con azul de Coomassie. B) Autorradiografía del mismo gel (ver detalles de marcaje con [^{35} S]-metionina y procesamiento en METODOS). Extractos celulares totales preparados a partir de cultivos bacterianos inducidos con IPTG durante 2 horas, portando el plásmido pAR3040 (canal 1) o el plásmido recombinante pARB2-A1 (canal 2). Las proteínas de cultivos que portan el plásmido pARB2-A1 que permanecieron insolubles después de los lavados en tampón NaCl 0,1 M (canal 3), NaCl 0,1 M más 0,1% de deoxicolato sódico (canal 4) y NaCl 0,5 M más 0,5% de deoxicolato sódico (canal 5). Sedimento del cultivo portando el plásmido pAR3040 tras el lavado en tampón NaCl 0,5 M y 0,5% de deoxicolato sódico (canal 6). Marcadores de peso molecular (canal M). Se indican la posición de los marcadores de peso molecular y se indican también con flechas las proteínas inducidas.

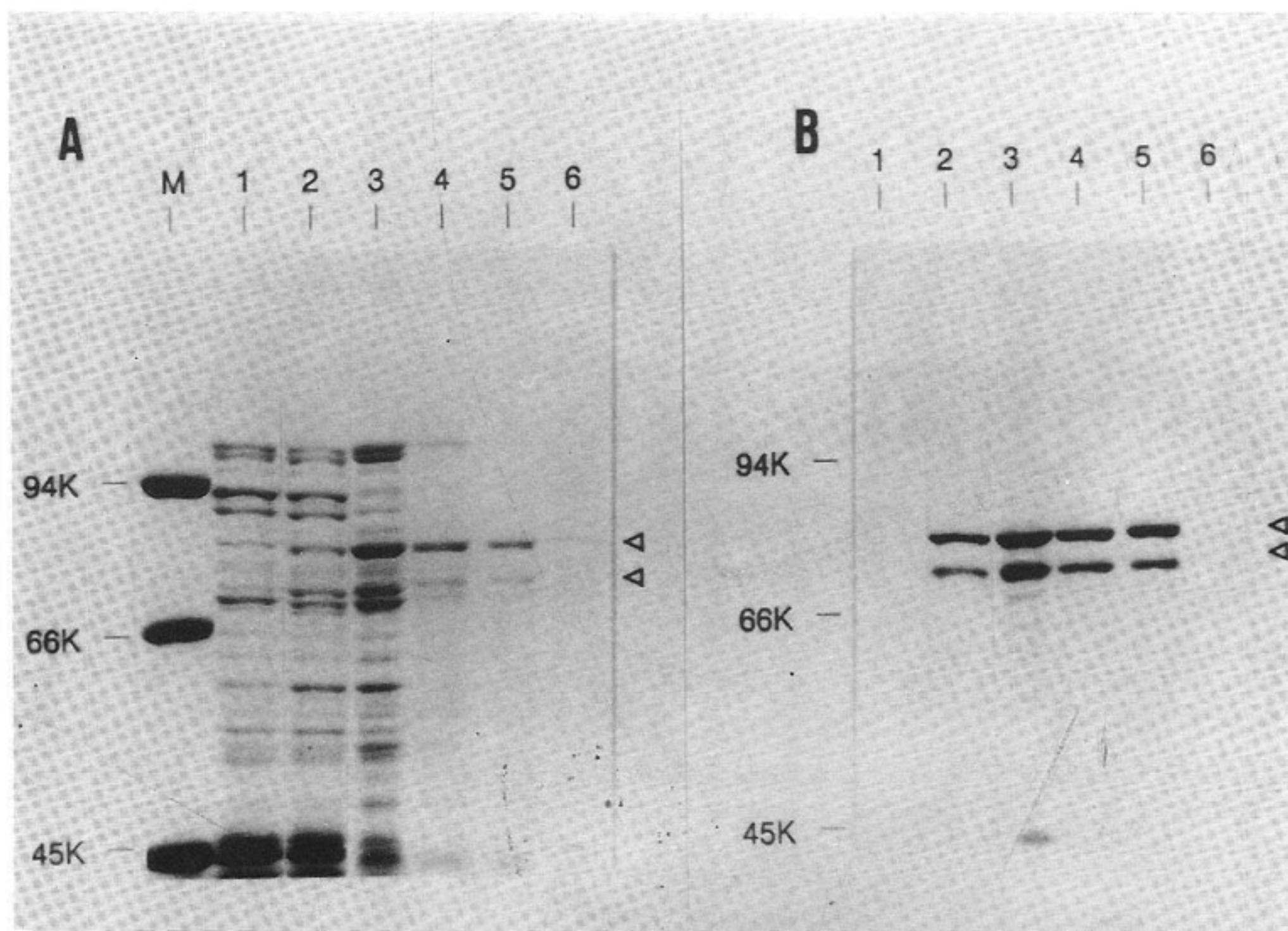
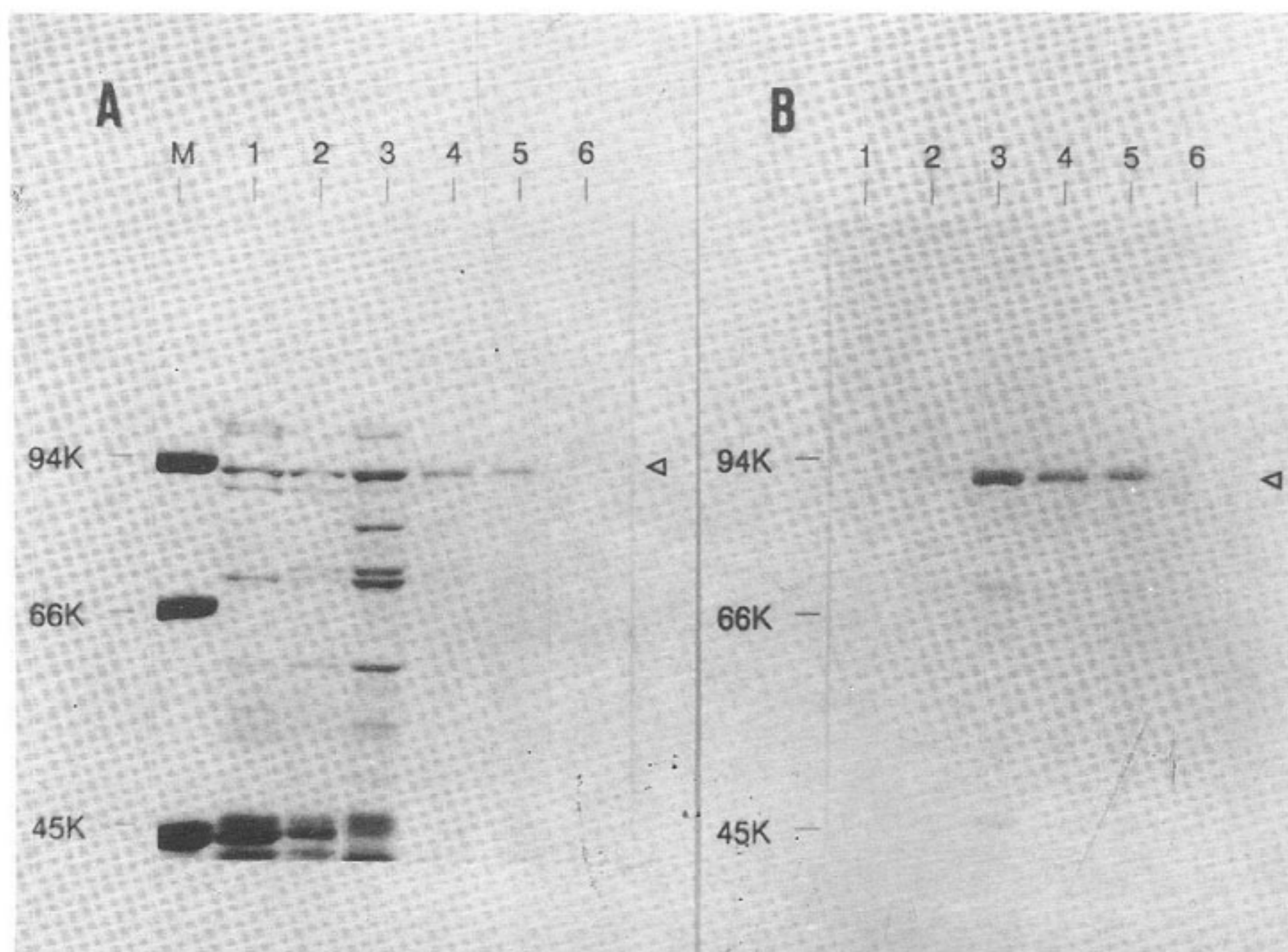


Figura 6. Análisis de las proteínas inducidas en bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS que transportan el plásmido pARB1-B1 por electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS. A) Gel teñido con azul de Coomasie. B) Autorradiografía del mismo gel (ver detalles de marcaje con [³⁵S]-metionina y procesamiento en METODOS). Extractos celulares totales preparados a partir de los cultivos bacterianos inducidos con IPTG durante 2 horas, portando el plásmido pAR3040 (canal 1) o el plásmido recombinante pARB1-B1 (canal 2). Proteínas del cultivo que portan el plásmido pARB1-B1 que permanecieron insolubles después de los lavados en tampón NaCl 0,1 M (canal 3), NaCl 0,1 M más 0,1% de deoxicolato sódico (canal 4) y NaCl 0,5 M más 0,1% de deoxicolato sódico. Sedimento del cultivo portando el plásmido PAR3040 tras el lavado en tampón NaCl 0,5 M más 0,1% de deoxicolato sódico (canal 6). Marcadores de peso molecular (canal M). Se indican la posición de los marcadores de peso molecular y se indica también con una flecha la proteína inducida.



REFERENCIAS

1. Lamb, R.A. (1989) Genes and proteins of influenza viruses. En: R. M. Krug (Ed). The Influenza Viruses. Plenum, New York, pg. 1-87.
2. Horisberger, M. A. (1982) Identification of a catalytic activity of the large basic P polypeptide of influenza virus. *Virology* **120**: 279-286.
3. Braam, J., Ulmanen, Y., Drug, R.M. (1983) Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**: 609-618.
4. Huang, T.S., Palese, P., Krystal, M. (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J. Virology* **64**: 5669-5673.
5. Krug, R.M. (1983) Transcription and replication of influenza virus. En: P. Palese and D.W. Kingsbury (Eds). *Genetics of Influenza Viruses*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, pg. 71-89.
6. Akkina, R.K., Chambers, T.M., Londo, D.J., Nayak, D.P. (1987) Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J. Virology* **61**: 2217-2224.
7. Detjen, B.M., St Angelo, C., Katze, M.G., Krug, R.M. (1987) Influenza polymerase P proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in form of a complex. *J. Virology* **61**: 16-22.
8. St. Angelo, C., Smith, G., Summers, M.D., Krug R.M. (1987) Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors form a complex in insect cells. *J. Virology* **61**: 361-365.
9. Digard, P., Blok, V.C., Inglis, S.C. (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**: 162-169.
10. Plotch, S., Bouloy, M., Ulmanen, Y., Krug, R.M. (1981) A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**: 847-858.
11. Ulmanen, Y., Broni, B.A., Krug, R.M. (1981) The role of two of the influenza virus core proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 7355-7359.
12. Romanos, M.A., Hay, A.J. (1984) Identification of the influenza virus transcriptase by affinity-labeling with pyridoxal 5'-phosphate. *Virology* **132**: 110-117.
13. Inglis, S.C., Carrol, R.A., Lamb, R.A., Mahy, B.W.J. (1976) Polypeptides specified by the influenza virus genome Y. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**: 489-503.
14. Kawakami, K., Ishihama, A., Amaguchi, M. (1981) RNA polymerase of influenza virus I. Comparison of the virion-associated RNA polymerase activity of various strains of influenza virus. *J. Biochemistry* **89**: 1751-1757.
15. Studier, F.W., Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
16. Bárcena, J., Ochoa, M., de la Luna, S., Melero, J.A., Nieto, A., Ortín, J., Portela A. (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virology* **68**: 6900-6909.
17. Ochoa, M., Bárcena, J., de la Luna, S., Melero, J.A., Douglas, A.R., Nieto, A., Ortín, J., Skehel, J.J., Portela, A. (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Research* **305-315**.
18. de la Luna S. (1989) Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
19. Rosenber, A.H., Lade, B.N., Chou, D., Lin, S.W., Dunn, J.J., Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
20. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 ARN polymerase to direct the expression of cloned genes. En: D.V. Goeddel (Ed) *Gene Expression Technology. Methods in Enzimology* **185**: 60-89.
21. Birboim, H.L., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* **7**: 1513-1523.
22. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York.
23. Sanger, F., Micklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
24. Hanahan, D. (1985) Thecniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA Cloning A Practical Approach Vol I*. D.M. Glover (Ed) IRC Press Limited, Oxford pg. 109-135.
25. Grunstein, M., Hogness, D.S. (1975) Colony hybridization: A method for isolation of cloned DNAs that contain specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72** 3961-3965.
26. Studier, F.W. (1973) Analysis of bacteriophage T7 earlyRNAs and proteins on slab gels *J. Mol. Biol.* **79**: 237-248.

27. Moffat, B.A., Studier, F.W. (1987) T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**: 221-227.
28. Morris, C.E., Klement, J.F., McAllister, W.T. (1986) Cloning and expression of the bacteriophage T3 RNA polymerase gene. *Gene* **41**: 193-200.
29. Carbonetti, N.H., Sparling, F. (1987) Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, mayor outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 9084-9088.
30. McKiney, J.D., Lee, J., O'Neill, R.E., Goldfarb, A. (1987) Overexpression and purification of a biologically active rifampicin-resistant β subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Gene* **58**: 13-18.
31. Smith, M.A., Napier, J.A., Stymne, S., Tathan, A.S., Shewry, P.R., Stobarts, A.K. (1994) Expression of a biologically active plant cytochrome b5 in *Escherichia coli*. *Bioch J.* **303**: 73-79.
32. Kozak, M. (1983) Comparision of initiation of protein sinthesis in prokaryotes, eukaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* **47**: 145.
33. Hockney, R.C. (1994) Recent developments in heterologoud protein production in *Escherichia coli*. *TIBTECH.* **12**: 456-463.
34. Ivanoff, L.A., Towatari, T., Ray, J., Korant, B.D. (1986) Expression and site-specific mutagenesis of the poliovirus 3C protease in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 5392-5396.
35. Sekine, S., Muzukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itho, S., Kawauchi, H. (1985) Cloning and expresión of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 4306-4310.
36. Zurawski, S., Mosmann, T.R., Benedick, M., Zurawski, G. (1986) Alterations in the amino-terminal third of mouse interleukin 2: Effects on biological activity and immunoreactivity. *J. Immunology* **137**: 3354-3360.
37. Goliger, J.A., Roberts, J.W. (1987) Bacteriophage 82 gene Q and Q protein. Sequence, overproduction and activity as transcription anti-terminator in vitro. *J. Biological Chem.* **262**: 11721-11725.
38. Kane, J.F., Hartley, D.L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *TIBTECH.* **6**: 95-100.