



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

AISLAMIENTO DE UN FRAGMENTO INMUNOGENICO  
DE TOXINA TETANICA

Tesis que presenta Joel Osuna Quintero  
para obtener el grado de Maestro en  
Investigación Biomédica Básica.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología  
Cuernavaca, Morelos. 1989.

03062  
28/11

RECEIVED  
BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
CENAHUAC  
MAY 19 1989



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.

**INTRODUCCION.**

General.....1  
Toxina tetánica.....4

**OBJETIVOS.....10**

**JUSTIFICACION.....11**

**MATERIALES Y METODOS.....15**

**RESULTADOS.**

Detección del gene de la toxina tetánica.....22

Identificación del fragmento de DNA que codifica para el fragmento C y construcción de un banco genómico.....24

Clonación del fragmento de DNA que codifica para el fragmento C de la toxina tetánica.....25

Caracterización del fragmento de DNA clonado.....26

Clonación a vectores de expresión.....28

Expresión del fragmento de DNA aislado.....29

Inmunoidentificación.....30

Inmunoprecipitaciones.....32

**DISCUSION.....33**

**FIGURAS.....38**

**REFERENCIAS.....51**

## INTRODUCCION

### GENERAL.-

Los avances recientes en diferentes disciplinas tales como Biología Molecular, Inmunología e Ingeniería de Proteínas, son algunas de las razones por las cuales ha habido un creciente interés por el desarrollo de una nueva generación de vacunas. Existen muchas razones que justifican esta búsqueda de vacunas novedosas, no siendo la más frecuente la carencia de una vacuna convencional. Abaratar el costo de la producción, hacerlas más seguras o más eficientes o la posibilidad de poder generar vacunas multifuncionales han sido algunos de los motivos que han conducido a la implementación de metodologías modernas para la producción de vacunas. La aparición de nuevas compañías que apoyan financieramente esos proyectos es un ejemplo del importante mercado que se espera para estos nuevos productos (1).

De las rutas exploradas para la producción de estas nuevas vacunas, la más importante emplea metodologías de DNA recombinante. La identificación de los determinantes antigénicos protectores facilita el posterior aislamiento y manipulación de las regiones de los genes que los codifican. La expresión controlada de los genes de estos determinantes permite la producción masiva del producto y la manipulación necesaria para su purificación homogénea. Otro aspecto importante es que, además, se podría lograr su aislamiento de todos aquellos

productos indeseables, ya sean de la misma proteína o de otro producto del huésped original.

Finalmente, el aislamiento de diferentes determinantes protectores permitiría la posibilidad de generar vacunas polivalentes contra uno o mas patógenos. Esto es especialmente útil cuando el agente infeccioso presenta un ciclo de vida complejo. El aislamiento de determinantes protectores de diferentes etapas del desarrollo del patógeno nos proveería con una vacuna de amplio espectro de protección contra este (2).

Uno de los problemas mas graves que enfrenta este enfoque reduccionista de producción de vacunas, y que se ve acentuado en las alternativas que dependen de la utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos, es la pobre estimulación inmunológica que estos generan. Sin embargo, recientemente se han propuesto formas de sortear el problema mediante la presentación al sistema inmune de mezclas de péptidos representativos de determinantes responsables de estimular tanto al sistema inmune humoral como al sistema inmune celular (3). Este tipo de trabajos ha explicado inclusive las teorías acerca del uso de proteínas acarreadoras para aumentar la potencia inmunológica: la presencia de péptidos sintéticos capaces de estimular células B o células T del sistema inmune podría llegar a imitar de manera eficaz la potencia del complejo epitope-proteína acarreadora.

Todo lo anterior, mas los avances que se tienen en el desarrollo de adyuvantes novedosos (4), nos da una idea de lo que será la futura generación de vacunas.

## TOXINA TETANICA

Como se puede ver en la figura 1, en su forma extracelular, la toxina tetánica es una proteína constituida por dos subunidades: la cadena pesada de 100 Kdaltones y la cadena ligera de 50 Kdaltones unidas por un puente disulfuro. De manera similar a otras toxinas bacterianas (por ejemplo la toxina de difteria), la toxina tetánica es sintetizada por Clostridium tetani como una sola cadena polipeptídica. Sin embargo, debido a la acción de proteasas, la toxina es recuperada del sobrenadante de cultivo en una forma de dos subunidades polipeptídicas. La digestión con papaina de la toxina tetánica genera dos fragmentos: el fragmento B, el cual esta compuesto por la mitad amino terminal de la cadena pesada unida por el puente disulfuro a la cadena ligera, y el fragmento C, que representa la mitad carboxilo terminal de la cadena pesada.

A fin de ejercer los efectos tóxicos, la toxina tetánica debe viajar hasta su órgano blanco: la Médula Espinal. La primera etapa del mecanismo de acción de la toxina consiste en su unión, mediada por una molécula receptora, a las terminales nerviosas motoras. Se ha sugerido que la toxina se une a gangliosidos del tipo GD2 y GD1b en las terminales nerviosas motoras (mas adelante se discutirá la posible existencia de un segundo receptor de naturaleza proteica) y posteriormente es internalizada mediante

endocitosis y transportada intra-axonalmente por el proceso de transporte retrógrado.

Después de ser transportada a la sinápsis motora, la toxina causa la estimulación continua de la neurona motora. Hay evidencias de que la toxina actúa presinápticamente, afectando la liberación de neurotransmisores inhibitorios (glicina o GABA). El bloqueo de la liberación de neurotransmisores no es enteramente restringido a los del tipo inhibitorio, dado que en raros casos la toxina puede actuar periféricamente bloqueando la liberación de Acetilcolina causando de tal manera una parálisis flácida.

En resumen, a fin de ejercer su efecto tóxico común, la toxina tetánica debe ser unida e internalizada por una terminal nerviosa motora, viajar hacia el soma de la neurona, para posteriormente ser liberada al espacio sináptico a fin de interactuar con las terminales nerviosas inhibitorias. Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual la toxina lleva a cabo esta compleja ruta y actualmente existe un intenso estudio acerca del número de membranas con las cuales la toxina debe interactuar y/o cruzar.

Existe un conocimiento muy escaso acerca de los mecanismos por los cuales la toxina tetánica inhibe la liberación de neurotransmisores. Se sabe que los neurotransmisores son sintetizados en las terminales nerviosas y empacados en vesículas sinápticas. La liberación ocurre por excitación de la vesícula o



de su contenido y parece depender de un incremento de la concentración de calcio axoplásmico durante la transmisión del impulso nervioso. Las fracciones puras de membranas sinaptosomales contienen actina y las vesículas sinápticas están cubiertas con miosina: la liberación del neurotransmisor puede involucrar, por lo tanto, el contacto entre vesículas y membrana presináptica con la formación de una proteína tipo actomiosina la cual posee actividad de ATPasa dependiente de calcio. En presencia de calcio, la hidrólisis de ATP podría causar la contracción de la proteína induciendo un cambio en la vesícula sináptica y la secreción de neurotransmisor. Se ha demostrado que la toxina tetánica se une a la proteína tipo actomiosina, disminuyendo su habilidad contráctil mediante la inhibición de su actividad de ATPasa dependiente de calcio. De tal forma, la toxina tetánica puede bloquear la liberación del neurotransmisor mediante la inhibición de la contracción de la proteína tipo actomiosina y la posterior exocitosis de la vesícula sináptica o de su contenido.

Se ha sugerido también que la toxina tetánica podría actuar mediante un efecto al metabolismo de los nucleótidos cíclicos. En la parálisis de iris inducida por toxina tetánica, se ha observado una reversión temporal del efecto de la toxina por la adición de nucleótidos cíclicos o por la adición de teofilina, la cual inhibe la actividad de fosfodiesterasa (antagonista de nucleótidos cíclicos). Los nucleótidos cíclicos parecen tener un papel importante en la transmisión sináptica, probablemente

manteniendo la integridad de la vesícula sináptica y pueden estar involucrados también en la entrada de calcio a las terminales nerviosas, de tal forma que la alteración del metabolismo de los nucleótidos cíclicos por la toxina tetánica podría tener influencias sobre la liberación de los neurotransmisores.

Existen hipótesis atractivas (9) que proponen que la toxina o algún fragmento de ésta pudiera tener cierta afinidad por los sitios que unen calcio de la proteína blanco de la toxina. La toxina competiría con el calcio libre por la unión a esos sitios. La unión de la toxina podría inactivar la proteína blanco al impedir que adopte la estructura activa.

La mayoría de los investigadores piensan, aunque sin muchas evidencias, que, al igual que otras toxinas, la toxina tetánica podría tener un sitio intracelular de acción, sin embargo se desconoce si este tipo de acción pudiera ser de naturaleza enzimática.

Analizando el mecanismo de acción propuesto para la toxina, es atractiva la aparente relación que surge entre estructura y función de la molécula. Al parecer, las principales etapas del mecanismo de acción: unión al receptor, formación de poros en la vesícula endocítica y la supuesta acción enzimática, podrían llevarse a cabo por diferentes dominios estructurales de la molécula.

El estudio con fragmentos de la toxina ha permitido identificar algunos de estos dominios estructurales: existen evidencias que el dominio involucrado en la unión del receptor se encuentra codificado por la región carboxilo terminal de la molécula, específicamente por el fragmento C de la toxina (5). Se ha encontrado que bajo condiciones de pH ácido la región amino terminal de la cadena pesada tiene la capacidad de insertarse en vesículas lipídicas y de esta manera poder formar poros en la membrana (6) y existe la hipótesis que la cadena ligera podría ser responsable de la actividad (probablemente enzimática) necesaria para la inhibición de la liberación de los neurotransmisores (7).

Más recientemente, se ha encontrado que la toxina completa, el fragmento B y la cadena ligera pero no el fragmento C, son capaces de inhibir la exocitosis de células cromafines en cultivo (8). Dado que las células carecen del receptor específico de la toxina, se ha especulado que la molécula blanco de la toxina pudiera estar involucrada en el mecanismo general de exocitosis.

Existe cierta controversia respecto a la naturaleza del receptor que emplea la toxina para unirse a las células neuronales. Se supone que el receptor que utiliza la toxina es un gangliósido; sin embargo, se ha propuesto la existencia de un segundo receptor necesario para la formación de un complejo ternario de alta afinidad compuesto por gangliósido-toxina-segundo receptor (10). Este receptor pudiera ser de naturaleza proteica y necesario para

la internalización de la toxina a la célula neuronal. Se ha propuesto que la interacción de la toxina con el gangliósido pudiera ser importante para permitir la interacción exitosa con este receptor proteico. Este hecho podría ser consecuencia directa del incremento de la concentración efectiva de toxina en cercanía al segundo receptor de menor afinidad que el gangliósido por toxina. Otra posibilidad es que la unión al gangliósido induce un rearrreglo conformacional de la toxina de tal forma que se incrementa su afinidad por el segundo receptor.

Los análisis de toxicidad e inmunogenicidad de fragmentos de la toxina han revelado que el fragmento C es un buen candidato para producción de una vacuna de subunidad en contra de tétanos. En estos estudios se ha demostrado que a pesar de existir determinantes antigénicos protectores en el fragmento B de la toxina, a dosis altas este fragmento es capaz de producir síntomas tóxicos (11). Estos síntomas son diferentes a los de tétanos y curiosamente, son similares a la parálisis flácida producida por la toxina botulínica.

A diferencia del fragmento B, el fragmento C no presenta ningún indicio de toxicidad y puede inducir anticuerpos protectores contra la toxina. Dado que en esta región se encuentra el dominio que interacciona con el receptor de la toxina no es sorprendente que anticuerpos contra este fragmento sean protectores contra tétanos.

## OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo de tesis consiste en el aislamiento de un fragmento de DNA del genoma de Clostridium tetani que codifique para el fragmento C de la toxina. Dicho fragmento se utilizará para la producción en E. coli de proteínas de fusión acarreadoras del fragmento C de la toxina. Finalmente, se tratará de caracterizar inmunológicamente al fragmento así producido.

Es necesario hacer notar que la cepa de C. tetani empleada para el aislamiento del DNA genómico proviene de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud (G.G.B.R.), productores en nuestro país de la vacuna contra tétanos: el toxoide tetánico.

## JUSTIFICACION

El método convencional de producción de la vacuna contra tetanos se basa en el principio de detoxificación de la toxina sin eliminar sus propiedades inmunogénicas. La preparación del toxoide tetánico consiste en el tratamiento con formaldehído de toxina semi-purificada. Usualmente, la toxina es recuperada del medio de cultivo en una forma semi-cruda para posteriormente ser tratada con formaldehído para producir al toxoide. El toxoide así producido posteriormente pasa por varias etapas de purificación por filtración. El tratamiento con formaldehído, bajo las condiciones usadas para producir al toxoide, da como resultado la formación de enlaces metilénicos tanto intramoleculares como intermoleculares. La formación de enlaces intermoleculares permite la aparición de formas polimerizadas. La presencia de polímeros en las preparaciones de toxoide da lugar a la aparición de una actividad floculante reducida cuando se compara toxoide contra toxina tetánica. Las vacunas para uso en humanos comúnmente consisten de toxoide semi-purificado cuya actividad floculante específica se encuentra en un rango de 1000 a 2000 unidades Lf por miligramo de proteína.

Normalmente, las preparaciones de toxoide están sujetas a varias pruebas, incluyendo las pruebas de potencia, ausencia de toxicidad, esterilidad, actividad floculante, pureza, contenido de formaldehído libre, y la prueba de irreversibilidad de toxicidad.

La producción de una vacuna recombinante o sintética en contra de la toxina tetánica podría tener consecuencias importantes en algunas de las etapas de la producción de la vacuna convencional. En primer lugar, podría reducirse a niveles mínimos los peligros inherentes que ocasiona el manejo de cepas bacterianas de alto riesgo y la producción masiva de material tóxico. Dado que la vacuna alternativa consistiría de regiones inmunogénicas y no tóxicas de la toxina y ya que su producción se llevaría a cabo en un huésped de características inócuas, el aparato de seguridad necesario durante la producción convencional sería irrelevante y podría ser reducido a un mínimo.

Otra ventaja que se hace aparente con la producción de una vacuna alternativa de naturaleza no tóxica consiste en la producción de lotes más homogéneos de vacuna en comparación con los producidos por el método convencional. Dado que la producción de la vacuna alternativa no dependería de etapas de detoxificación del producto, se evitaría una fase que es esencial para la calidad del producto convencional.

Finalmente, existen ciertas reacciones secundarias que se presentan en algunos sujetos inoculados con toxoide tetánico que podrían eliminarse con el uso de una vacuna alternativa. Estas reacciones secundarias se le han adjudicado al toxoide mismo. Adicionalmente, la presencia de determinantes antigénicos

extraños a los de la toxina pudiera ser la causa de los fenómenos de hipersensibilidad presentados.

Considero que una importante justificación para llevar a cabo este proyecto es que su realización permite la interacción de grupos del sector salud, encargados de producción de vacunas, con grupos dedicados a la investigación en biología molecular. Esto debería fomentar la incorporación de enfoques nuevos al desarrollo de vacunas de interés nacional.

Otro aspecto que es necesario justificar consiste en nuestra estrategia de trabajo. Inicialmente nuestro plan de trabajo involucraba una etapa inicial de búsqueda e identificación inmunológica del fragmento C de la toxina a partir de un banco de expresión de fragmentos de DNA del genoma de C. tetani clonados en el vector de expresión gtl1, debido a que el gene no había sido clonado. Sin embargo, coincidente al inicio del trabajo dos grupos de investigación en forma independiente publicaron datos de secuencia nucleotídica del gene de la toxina tetánica. Esto modificó el plan de trabajo hacia la estrategia que se desarrolla en esta tesis. Debido a que el material biológico reportado no está disponible, ya que pertenecen a compañías privadas, decidimos iniciar el proyecto en la etapa de búsqueda y aislamiento de una región de DNA similar a la reportada utilizando la cepa de C. tetani que se emplea para la producción de la vacuna convencional contra tétanos en nuestro país. Asimismo, algunos de los experimentos realizados tienen su



contraparte o utilizan información de investigación desarrollada paralelamente por los grupos mencionados (datos de secuencia necesarios para el diseño de las sondas moleculares empleadas para rastrear el gene de la toxina).

Con todo lo anterior, consideramos correcto colaborar en esta etapa temprana de producción de una vacuna alternativa al toxoide tetánico: caracterización a nivel de DNA del fragmento C de la toxina y a nivel inmunológico del fragmento expresado en E. coli

## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Cepas bacterianas y Plásmidos.

Para este trabajo se utilizaron las cepas HB101 y JM101 y la cepa P678-54 que produce minicélulas (17), los plásmidos pUC12 y pUC13 (12). El DNA de C. tetani se obtuvo de la variante tóxica no esporulante E88 de la cepa Massachusetts.

### 2.- Preparación de DNA recombinante.

El trabajo con el DNA de los plásmidos se llevo a cabo esencialmente de la forma que resumen Maniatis et. al.(18) Las endonucleasas de restricción, la ligasa de DNA del fago T4, y el fragmento grande de la polimerasa I de DNA de E. coli (fragmento Klenow) se obtuvieron de New England Biolabs. Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de los siguientes distribuidores: Sigma, Baker o Bio-Rad.

### 3.- Purificación de DNA total de C. tetani.

El procedimiento consistió básicamente en una etapa de lisis de las células con SDS. Finalmente, se llevan a cabo etapas de extracción fenol/cloroformo y precipitación del DNA total.

### 4.- Transformación.

Las cepas de E. coli utilizadas en el estudio, fueron transformadas según el método de Cohen et. al., (19) que básicamente consiste en la permeabilización de la membrana bacteriana por el tratamiento con CaCl 100mM, seguido de un choque térmico a 42 C y recuperación de las células.

### 5.- Purificación de DNA de plásmido.

El método utilizado para la purificación de plásmido de volúmenes grandes ( comunmente mayores a 250 ml ), fué el de la lisis alcalina descrito por Maniatis et. al. (17) el cual incluye un gradiente isopicnico de Cloruro de Cesio.

### 6.- Microensayo de DNA de plásmido.

La obtención de DNA de plásmido de volúmenes pequeños de cultivo ( 3 a 5 ml ), fué realizada por el método de lisis alcalina descrito por Rodriguez y Tait (20).

## 7.- Electroforésis de DNA.

Se siguieron las condiciones descritas por Maniatis et. al.(17) en lo que respecta a geles nativos o desnaturalizantes de agarosa y acrilamida.

## 8.- Transferencia de DNA a soportes sólidos.

Para la transferencia de DNA separado electroforéticamente en geles de agarosa o acrilamida se utilizó el metodo de Southern (21), que básicamente consiste en tratar el gel con una solución desnaturalizante ( hidroxido de sodio ) y posteriormente con una solución neutralizante ( Tris-HCl ). La transferencia al soporte sólido se lleva a cabo por capilaridad. Para fijar el DNA al soporte, la membrana se hornea a 80 C por 2 horas.

## 9.- Síntesis y purificación de oligonucleótidos.

La síntesis se llevo a cabo manualmente por el metodo de fosfotriester en fase sólida descrito por Ito et. al.(22) utilizando bloques de dimeros o trimeros previamente sintetizados. Esencialmente el método consiste en ciclos de acoplamiento de bloques de nucleótidos con etapas intermedias de enmascaramiento y desbloqueo de los grupos reactivos. La purificación de los oligonucleótidos así sintetizados se llevo a cabo en geles de poliacrilamida preparativos. Las bandas de oligo se visualizaron por sombreado con UV del DNA en el gel sobre placas

de silica-gel fluorescentes y se cortaron para eluirse de la acrilamida con agua a 37 C. Para eliminar la urea, se liofilizó la solución de elución y posteriormente se hicieron varios lavados con etanol.

#### 10.- Preparación de las sondas radiactivas.

De 10 a 20 pmolas del oligo apropiado se trataron con la polinucleótido cinasa de T4 en presencia de 50 a 100 uCi de P-ATP en buffer de cinasa (Maniatis). Para eliminar la marca no incorporada se utilizaron columnas de DEAE-celulosa o de Sephadex G-50. En el caso de usar columnas de DEAE-celulosa los lavados de la marca no incorporada se hicieron con NaCl 0.2 M en buffer TE y la elución del oligo se realizó con NaCl 0.5 M en buffer TE. En Sephadex G-50 el oligo se eluyó con buffer TE tomando alicuotas de 2 gotas cada una. En ambos casos, después de determinar la actividad específica obtenida, los oligos radiactivos se utilizaron directamente.

#### 11.- Ensayos de hibridación DNA-DNA.

Para el caso de hibridación en colonia, éstas se transfieren cuidadosamente a discos de nitrocelulosa o de Whatman 540. Para ambos casos existen etapas de desnaturalización/lisis de las colonias con NaOH y de neutralización del pH. En el caso de usar nitrocelulosa existe una etapa extra de fijación del DNA a la membrana. Las hibridaciones tanto de membranas de Southern como

de hibridación en colonia se llevaron a cabo a 42 C durante toda la noche en presencia de por lo menos  $5 \times 10^6$  cpm de la sonda utilizada. La exposición de las membranas radiactivas se llevó a cabo a -70 C utilizando doble pantalla de exposición durante toda la noche. Normalmente los lavados se hicieron en SSC 6X a diferentes temperaturas dependiendo del ruido de fondo obtenido.

#### 12.- Electroforésis de proteínas.

Las muestras de proteínas se analizaron en geles de 10 y 15% de poliacrilamida-SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (23). Esencialmente, las proteínas se solubilizan en un baño de agua hirviendo y en presencia de un amortiguador desnaturalizante. Antes de cargar el gel las muestras se centrifugan brevemente para eliminar los restos insolubles. El gel se corre a 5 mA hasta que las muestras penetran al gel separador, posteriormente el gel se corre a 15 mA por 3 o 4 horas. Después de la electroforésis, el gel es teñido con azul de Coomassie.

#### 13.- Preparación de minicélulas.

El método utilizado para la preparación de minicélulas depende de la utilización de gradientes de sacarosa y ha sido descrito por Meager et. al. (24) Para el ensayo de síntesis de proteínas se utiliza un medio de cultivo libre de metionina, la cual es suministrada separadamente en forma radiactiva. Previo a

esta etapa se recomienda una preincubación de 15 minutos en ausencia de S -Metionina para depletar los mRNA endógenos. Las muestras así obtenidas se tratan como se indica en electroforesis de proteínas. El gel se seca al vacío y se expone a placa autoradiográfica a temperatura ambiente durante toda la noche.

#### 14.- Transferencia de proteínas a soportes sólidos e inmunoreacción.

Las proteínas separadas por gel fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa esencialmente como lo describe Towbin et. al.(25). La reacción con los anticuerpos se llevó a cabo básicamente como lo recomienda el proveedor del ensayo utilizado ( Promega ). Brevemente, existen etapas de bloqueo de sitios inespecíficos de unión a proteínas, reacción con el anticuerpo dirigido contra el antígeno deseado y reacción de un segundo anticuerpo dirigido contra el primero y acoplado a fosfatasa alcalina. Finalmente, se desarrolla una reacción de color con reactivos suministrados en el paquete distribuido por el proveedor.

#### 15.- Inmunoprecipitaciones.

El método utilizado sigue al reportado por Mellman et. al. (26) y consiste en la lisis de las bacterias con detergente , una reacción de los antígenos con la dilución apropiada del anticuerpo requerido y precipitación del complejo antígeno-

anticuerpo en presencia de proteína A-sefarosa ( Pharmacia ). Se recomienda pre-adsorber el anticuerpo y los antígenos con extracto de proteínas de E. coli y con proteína A-sefarosa respectivamente.

#### 16.- Secuencia de DNA.

Esta se llevó a cabo por el método de Sanger et. al.(27) utilizando Sequenasa ( USB ) y el procedimiento descrito por los mismos proveedores del ensayo tanto para la purificación de templado y reacciones de polimerización como para la preparación y tratamiento del gel de secuencia. Se utilizó como isótopo radiactivo S- thio dATP y la exposición autoradiográfica fue a temperatura ambiente durante toda la noche.

#### 17.- Contención biológica.

Parte de este trabajo fue realizado bajo instalaciones de contención biológica y confinamiento físico del tipo P-2 y con el uso de vectores apropiados para manipulaciones genéticas del tipo descrito en este trabajo.



## RESULTADOS

### Detección del gene de la toxina.

Dado que existe un riesgo al trabajar con C. tetani, se decidió llevar a cabo todos los experimentos de aislamiento de DNA y clonación de la región que codifica para el fragmento C de la toxina bajo un sistema de confinamiento físico tipo P-2. Esto se continuaría hasta no estar seguros de tener aislada la región de DNA que codifica para el fragmento C, el cual se sabe no presenta ningún indicio de toxicidad y es capaz de inducir anticuerpos protectores contra la toxina tetánica.

La primera etapa del presente trabajo consistió en aislar DNA total de la bacteria C. tetani que emplea el Sector Salud del país para la producción del toxoide tetánico. Cabe hacer notar que los cultivos de C. tetani se llevaron a cabo en la misma G.G.B.R. bajo sus condiciones de seguridad. La G.G.B.R. nos suministró una pastilla celular congelada para el aislamiento del DNA total de la bacteria.

Para detectar el gene de la toxina empleamos como sonda molecular oligonucleótidos (oligos) sintéticos complementarios a la región que nos interesa del gene: la región que codifica para el fragmento C de la toxina. Se sintetizaron varios oligos

dirigidos contra esta región a partir de los datos de secuencia ya publicados. (figura 2)

Usando técnicas de hibridación del tipo Southern, logramos detectar fragmentos de DNA del genoma de C. tetani que son homólogos a los oligos empleados como sondas (figura 3). Para la caracterización del gene de la toxina utilizamos diferentes enzimas de restricción de tal forma que se pudiera identificar un fragmento de DNA que codifique para el fragmento C y que fuera similar al fragmento reportado por los grupos que aislaron el gene completo de la toxina.

Analizando la fotografía del mismo gel mostrado en la figura 3, pero teñido con bromuro de etidio, no parece haber habido digestiones parciales del DNA total digerido con las enzimas de restricción empleadas, por lo que las bandas extras que aparecen pudieran provenir de hibridación secundaria a otras regiones. Como se puede observar en esa misma figura, las digestiones del DNA con las enzimas Eco RI y Bgl II producen un fragmento de DNA del tamaño esperado, aproximadamente 2000 y 3200 pares de bases respectivamente. De acuerdo al mapa del gene de la toxina mostrado en la figura 2 no existen sitios cercanos para la enzima Bam HI, por lo que se produce una banda de alto peso molecular al digerir el DNA total con esta enzima de restricción. La digestión con Eco RI produce un fragmento de aproximadamente 2000 pares de bases. Dado este resultado, tendríamos que añadir otro sitio de Eco RI alrededor de la región de 6 Kb del mapa del gene de la

toxina mostrado en la figura 2 y no reportado por el grupo de Eisel et. al. (14).

Identificación del fragmento de DNA que codifica para el fragmento C y construcción de un banco genómico.

Para tener una base racional en el aislamiento del fragmento de interés, se verificó la presencia de los sitios mas relevantes en el DNA total. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos en hibridaciones tipo Southern de muestras de DNA total de C. tetani digerido simultáneamente con dos enzimas de restricción diferentes. Comparando estos resultados con los mostrados en la figura 2, las bandas que aparecen en la hibridación con el oligo 1 como sonda molecular son todas del tamaño esperado. La digestión que se muestra en el carril 4 de la figura 4A no fué total, eso explica la aparición de las dos bandas. La doble digestión Eco RI/Hpa II mostrada en el carril 3 de la figura 4B, produce un fragmento de tamaño idéntico al producido por la digestión con la enzima Hpa II sola, dado que los sitios de reconocimiento para esta enzima se encuentran internos en el fragmento de DNA producido por la enzima Eco RI (figura 2).

Por razones de seguridad, a fin de evitar clonar el gene entero de la toxina, decidimos construir un banco de fragmentos de DNA purificados de gel y en un rango de 2000 a 4000 pares de bases. Eligimos como candidato el fragmento de alrededor de 3000 pares

de bases producido con la enzima de restricción Bgl II. De acuerdo a la secuencia reportada, esta región corresponde al fragmento C de la toxina y se extiende a la región 3' no codificadora del gene de la toxina. Además, este fragmento de DNA contiene también una porción del fragmento B. Los fragmentos puros se insertaron en el vehículo de clonación pBR327 en su sitio de Bam HI que es compatible con los extremos de DNA producidos por la endonucleasa Bgl II.

Clonación del fragmento de DNA que codifica para el fragmento C de la toxina.

Utilizando los mismos oligos de los experimentos de detección del gene de la toxina, rastreamos por hibridación en colonia varios filtros representativos del banco de fragmentos de DNA aislados del genoma de C. tetani. Se identificaron varias clonas positivas (figura 5) y procedimos a la purificación del DNA del plásmido de algunas de éstas para continuar con la caracterización de las clonas portadoras del fragmento de DNA que codifica para el fragmento C de la toxina. En la figura 5, la colonia marcada con la flecha podía ser tomada de manera aislada, por lo que decidimos caracterizar especialmente su DNA del plásmido. Se purificó también, el DNA del plásmido de varias colonias alrededor de alguna señal positiva en la autoradiografía, dado que fué prácticamente imposible identificar claramente la colonia de la cual provenía la señal.

### Caracterización del fragmento de DNA clonado.

La caracterización del inserto de DNA se llevó a cabo a través del uso de los datos de secuencia ya reportados de esta región y por lo tanto de sitios de restricción únicos en el fragmento como Eco RI y Acc I. Dado que el vector posee también sitios de reconocimiento para estas endonucleasas, esto nos permite mapear de manera exacta la orientación de nuestro inserto con respecto a nuestro vehículo de clonación. En la figura 7 se muestra un mapa preliminar de una de nuestras clonas. El esquema muestra la posición de los oligos usados como sondas en los Southern que se muestran en la figura 6-b. Como se puede observar en esta figura las bandas que aparecen pueden explicarse a partir de un mapa de nuestro inserto como el que se mostró anteriormente. En otros experimentos (no mostrados) de mapeo más fino con diferentes enzimas de restricción aparecieron algunas irregularidades como la presencia de sitios no previstos para algunas enzimas de restricción dado el evento de clonación deseado. Como se puede observar en la figura 7 existe una región desconocida hacia arriba de la parte 5' terminal de nuestro inserto. Este fragmento extra puede provenir de un evento indeseable de la clonación y, por carecer de algunos sitios de restricción esperados según la secuencia del gene de la toxina, se podría especular que no pertenece al gene de la toxina (ver figura 2 para una comparación).

En la figura 6A se muestran digestiones del DNA del plásmido purificado de varias colonias alrededor de la colonia positiva señalada con una flecha en la figura 5. El DNA del plásmido para esta colonia se encuentra en el carril 2 digerido con la enzima Eco RI y en el carril 8 digerido con Acc I. Esta última digestión no fue total, sin embargo, las dos bandas inferiores de esa misma digestión son reales dado que la región desconocida, discutida anteriormente, parece tener otro sitio de Acc I.

Dada esta situación, decidimos volver a aislar un fragmento apropiado de esta clona e insertarlo en un vector tipo pUC. Para llevar a cabo lo anterior decidimos tomar el fragmento Bgl II-Hind III de nuestra clona candidata e insertarlo en el vector pUC 13. Esto posicionaría nuestro inserto en una forma tal que se impediría la producción de una proteína funcional y además permitiría tomar ventaja de los múltiples sitios para endonucleasas que poseen estos tipos de vectores para futuras clonaciones a vectores de expresión. La caracterización (no mostrado) con diferentes enzimas de restricción ya sea en digestiones sencillas, dobles o múltiples, nos ha permitido comparar el mapa de nuestro fragmento con el mapa ya reportado. Esto nos permite confirmar la identidad de nuestro fragmento como responsable para codificar el fragmento C de la toxina tétanica. A esta clona la llamaremos en adelante pUC13tetC.

### Clonación a vectores de expresión.

Como vectores de expresión decidimos utilizar uno de la misma familia de los pUC (12) gracias a su fácil manipulación y comprobada eficacia.

El primer vehículo recombinante de expresión que decidimos construir consistió de un fragmento Eco RI - Eco RI aislado del vector pUC13tetC e insertado en el sitio Eco RI del vector pUC 12 (ver figura ). Este fragmento acarrearía una pequeña porción del multisitio de clonación del vector y casi en su totalidad el fragmento C y, lo mas importante, se eliminaría toda la región 3' no codificadora del gene de la toxina (ver figura 8).

Las secuencias reportadas tanto del gene de la toxina como la del vector de clonación permiten predecir que la unión entre el fragmento clonado y la región que codifica para los primeros aminoácidos de B-galactosidasa quedaría fuera de fase abierta de lectura durante la traducción del mensajero recombinante (figura 8). Para corregir tal defecto decidimos digerir en forma parcial el vector recombinante con la enzima Eco RI. El tratamiento con el fragmento Klenow de la polimerasa del producto lineal así producido nos debería corregir la fase de lectura en nuestro inserto, dando origen a un producto de 495 aminoácidos ( 59 Kdaltones).

### Expresión del fragmento de DNA aislado.

Al analizar en geles de poliacrilamida y tinción de Coomassie, las proteínas totales extraídas de E. coli, bajo condiciones de inducción del promotor que regula la expresión de la proteína de fusión en el vector antes mencionado, no se logró identificar el producto esperado. Por lo tanto, decidimos llevar a cabo experimentos de expresión en minicélulas. Esto nos permitiría enriquecer productos específicos del vector de expresión y haciendo uso de metionina- S como sustrato para la síntesis de proteínas aumentaríamos nuestra sensibilidad de detección de algún producto dependiente de nuestro inserto de DNA y del peso molecular esperado.

En la figura 9 se muestra un experimento de expresión típico de minicélulas. Como se puede observar aparece un producto del peso molecular esperado (aproximadamente 59 Kdaltones) que es dependiente del vector con inserto. Esto es, el producto no aparece en minicélulas sin plásmido ni aparece tampoco en minicélulas con vector solo.

De acuerdo a esta misma figura, el control negativo del experimento, vector de expresión con inserto fuera de fase de lectura, nos produce una banda del mismo peso molecular al producto esperado. Un análisis posterior de la secuencia nucleotídica de esta construcción en la región de la fusión y del promotor reveló la aparición de una mutación espontánea



(inserción de un nucleótido) lo cual nos modificó la fase de lectura esperada, por lo que eso pudiera explicar el resultado obtenido. Mas adelante se discutirán otros resultados de experimentos similares hechos por M. E. Munguia en nuestro laboratorio.

### Inmunoidentificación.

Habiendo identificado un producto del peso molecular apropiado decidimos llevar a cabo las pruebas preliminares de reactividad con anticuerpos. Se repitieron en minicélulas experimentos similares a los anteriores y las proteínas separadas por el gel de poliacrilamida fueron transferidas electroforéticamente a nitrocelulosa. En este soporte sólido llevamos a cabo las pruebas de detección con los anticuerpos monoclonales.

Disponemos de diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra el fragmento B y C de la toxina tetánica (donados amablemente por el Dr. Habig del NIH). En la figura 10 se muestra un experimento típico de nuestros experimentos de inmunotransferencia tipo "western". En esta figura se muestra un experimento de inmunoreacción con los 3 anticuerpos bajo condiciones idénticas para cada uno de ellos. Como se puede apreciar la proteína inmunoreactiva aparece únicamente en las muestras tratadas con anticuerpos dirigidos contra el fragmento C. La exposición autoradiográfica de esta inmunotransferencia (no mostrado) resulta en la aparición de una banda que migra en el

peso molecular de la proteína que reacciona con los anticuerpos y previamente observada en los experimentos de expresión en minicélulas (ver figura 9).

En experimentos cuyos resultados no mostramos, se encontró que existe reacción cruzada de nuestros anticuerpos con los controles negativos incluyendo proteínas extraídas de minicélulas sin plásmido. La aparición de éste producto inmunoreactivo parece ser específico para los anticuerpos dirigidos contra el fragmento C, ya que el anticuerpo que reconoce al fragmento B no presenta inmunoreacción en ninguna de las condiciones probadas, incluyendo minicélulas sin plásmido. Es importante mencionar que tampoco tenemos pruebas contundentes que nos indique que el anticuerpo dirigido contra el fragmento B sea funcional, por lo que los resultados anteriores podrían deberse simplemente a la imposibilidad de llevarse a cabo cualquier tipo de inmunoreacción.

Dado que la aparición de la misma banda inmunoreactiva en minicélulas solas podría estar sugiriendo que el producto inmunoidentificado es un artefacto producido por reacción cruzada con una proteína del hospedero, decidimos realizar experimentos de inmunoprecipitación de las proteínas obtenidas de minicélulas utilizando un suero policlonal de caballo que clínicamente se utiliza como suero antitoxina tetánica.

### Inmunoprecipitaciones.

En la figura 11 se observa que existe una inmunoprecipitación deficiente del producto del peso molecular apropiado. Se puede observar que existe una reacción inespecífica con productos derivados de la proteína B-lactamasa codificada por el plásmido. Sin embargo, dada la relación que existe entre las diferentes proteínas reconocidas por el anticuerpo antes y después de la inmunoprecipitación, podría considerarse que existe un reconocimiento específico hacia el producto esperado como fragmento C. Es importante hacer notar que los anticuerpos monoclonales empleados funcionaron muy pobremente en los ensayos de inmunoprecipitación, por lo que los resultados mostrados se deben únicamente a los obtenidos con el antisuero policlonal de caballo.

Finalmente, en colaboración con María Elena Munguía se tienen datos de la secuencia de DNA del inserto aislado que confirman la identidad del fragmento. El proyecto se encuentra en la etapa de modificación dirigida del inserto para su sobreexpresión en E. coli.

## DISCUSION

En el presente trabajo se describe la clonación y caracterización de un fragmento de DNA de C. tetani que codifica para el fragmento C y una porción del fragmento B de toxina tetánica. La obtención de una señal positiva en los experimentos de Southern con diferentes oligonucleótidos sintéticos complementarios a la secuencia de DNA reportada del fragmento C y datos parciales de la secuencia nucleotídica de nuestro inserto son los criterios por los cuales afirmamos la identidad del fragmento clonado. La caracterización de este fragmento de DNA con diferentes enzimas de restricción parece indicar que aislamos un fragmento del gene de la toxina que es idéntico al reportado, al menos en las regiones de las cuales tenemos datos de secuencia nucleotídica.

Otros grupos (14) han presentado evidencias que demuestran que el gene estructural de la toxina se encuentra codificado en un plásmido de alto peso molecular. En nuestro caso decidimos no investigar esta posibilidad y detectamos el gene de la toxina a partir de DNA total aislado de nuestra cepa de C. tetani. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que el gene detectado este codificado por un plásmido de alto peso molecular que es purificado en el DNA total.

Por los resultados obtenidos no tenemos una evidencia clara de la identidad del producto codificado por el fragmento de DNA aislado. Los experimentos de expresión en minicélulas parecen

mostrar la formación de una proteína con el peso molecular apropiado la cual es codificada por el plásmido y dependiente del inserto. Sin embargo, al realizar la caracterización inmunológica de este producto los resultados obtenidos son confusos. Al parecer, existe una reacción cruzada de los anticuerpos con una proteína de minicélulas que comigra con el producto que suponemos es derivado de nuestro inserto de DNA (datos no mostrados). Esto podría sugerir que el producto que observamos en minicélulas es artefactual y no proviene de una expresión correcta del inserto que codifica para el fragmento C o que necesitamos validar la eficacia de los anticuerpos monoclonales. El hecho de que obtengamos resultados idénticos con dos anticuerpos diferentes que reconocen al fragmento C y no así con un anticuerpo dirigido contra el fragmento B, parece indicar que la reacción cruzada es de cierta especificidad. Es importante hacer notar que hasta el momento no tenemos ningún ensayo que nos indique la funcionalidad del anticuerpo dirigido contra el fragmento B, por lo que existe la posibilidad de que la respuesta negativa obtenida con este anticuerpo se deba simplemente a que este sea inservible.

En vista de los resultados anteriores, decidimos llevar a cabo experimentos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos policlonales antitoxina tetánica. De nueva cuenta, se obtuvieron resultados no muy satisfactorios. Existe inmunoprecipitación inespecífica de productos derivados de la B-lactamasa codificada por el plásmido. Sin embargo, pudimos inmunoprecipitar el producto que suponemos es derivado del inserto de DNA aislado.

Analizando el nivel de inmunoprecipitación de todas las proteínas parece existir un ligero enriquecimiento del producto deseado con respecto a algunas de las proteínas que suponemos inmunoprecipita inespecíficamente. El análisis de estos productos con anticuerpos policlonales en pruebas tipo "western" podrían ayudar a resolver el problema de inespecificidad de la inmunoreacción y en definir de manera mas precisa la naturaleza del producto deseado.

Dados los problemas presentados para la identificación inambigua del fragmento C de la toxina, los últimos experimentos de expresión del fragmento de DNA aislado realizados por M. E. Munguia en nuestro laboratorio se han llevado a cabo empleando diferentes vectores de expresión al presentado en este trabajo, los cuales cuentan ademas, con el origen de replicación del bacteriofago M13 y, por lo tanto de la ventaja de poder tener con mayor facilidad los datos de secuencia nucleotidica de cualquiera de las modificaciones requeridas para la expresión controlada del inserto de DNA. Sin embargo, y a pesar de los datos precisos de la secuencia nucleotidica de las diferentes construcciones no se ha podido identificar de manera rotunda un producto proteico específico para el fragmento C y, por lo tanto se carece aún de su inmunoidentificación.

Existen varios grupos interesados en la expresión de fragmentos de la toxina tetánica en E. coli (15 y 16), cuyos trabajos llevan considerable grado de avance. La primera fase consistió en el aislamiento y caracterización del gene completo de la toxina

tetánica. Posteriormente, se construyeron las fusiones apropiadas entre el fragmento C y diferentes proteínas acarreadoras y la expresión correspondiente de estas proteínas híbridas en el huésped E. coli. Sin embargo, se ha presentado el problema de baja producción de cualquier proteína híbrida acarreadora del fragmento C. El problema de pobre expresión se ha adjudicado tentativamente al uso de codones poco usuales que presenta el gene de la toxina. Al parecer, el gene de la toxina utiliza preferentemente codones de muy baja representatividad en E. coli. El análisis comparativo del gene de la toxina con genes de alta y baja expresión en E. coli permite agruparlo entre estos últimos. Además, se ha visto que en el gene de la toxina existe la tendencia de ocurrir grupos de codones particularmente distribuidos con alta frecuencia a todo lo largo del gene (H. M. E. Munguía, comunicación personal). Este uso de codones del gene de la toxina puede ser la causa de terminaciones prematuras que pudieran explicar los productos de bajo peso molecular que se han observado en los estudios de expresión en E. coli del fragmento C de la toxina. Sin embargo, a pesar de estos problemas las pequeñas cantidades que se han logrado producir de fragmento C han sido suficientes para que uno de los grupos reportaran protección eficiente contra dosis letales de toxina en ratones inoculados con fragmento C producido en bacteria (16). Además, no se tuvieron indicios de toxicidad del producto producido en bacteria.

En la siguiente etapa de este proyecto, despues de validar inmunológicamente como fragmento C a la proteina codificada por el fragmento de DNA que se tiene aislado, se tratará de contender con el problema del uso de codones haciendo énfasis especial en aquellos grupos continuos de: codones mas defectuosos con respecto a los utilizados en genes de alta expresión por E. coli. Suponemos que estas modificaciones permitirán una expresión mas regular del fragmento de DNA con lo cual se pueda obtener cantidades de producto sufici-entes para pruebas biológicas de inmunogénicidad y toxicidad en animales experimentales.



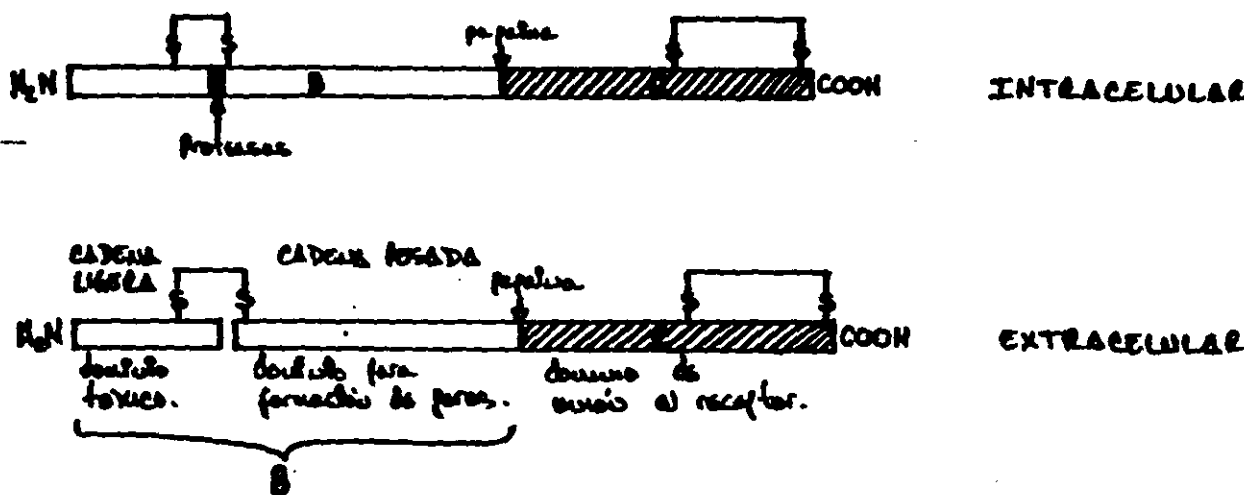


Figura 1.-

Esquema de la toxina tetánica donde se muestran los diferentes dominios estructurales propuestos para explicar algunas etapas del modo de acción de la toxina. Las representaciones corresponden a la forma intracelular y extracelular de la toxina. La flecha indica el sitio de corte de papaína para producir los fragmentos B y C de la toxina. La parte sombreada corresponde al fragmento C de la toxina.

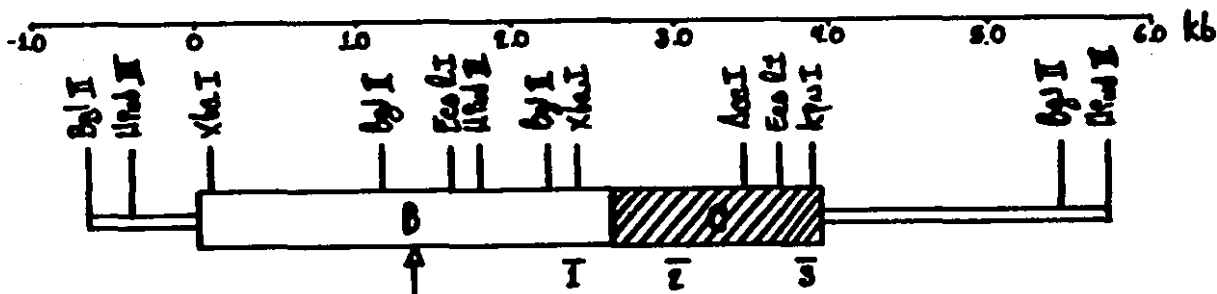


Figura 2.-

Mapa de restricción del gene de la toxina reportado por Eisel et. al. (14). Arriba de la figura se indican los sitios de reconocimiento mas relevantes de diferentes enzimas de restricción. Las barras bajo la figura indican las regiones complementarias a los oligos sintetizados para este proyecto. La región sombreada corresponde al fragmento C de la toxina y el resto codifica para lo que se conoce como fragmento B. La flecha indica el sitio aproximado donde ocurre la digestión con proteasas del producto final intracelular para producir de esta manera la forma extracelular de la toxina. El inicio de la zona sombreada, adyacente al oligo 1, posiciona el sitio sensible a papaina utilizado para la producción de fragmento B y C de la toxina.

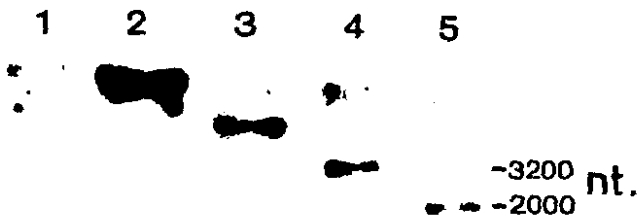
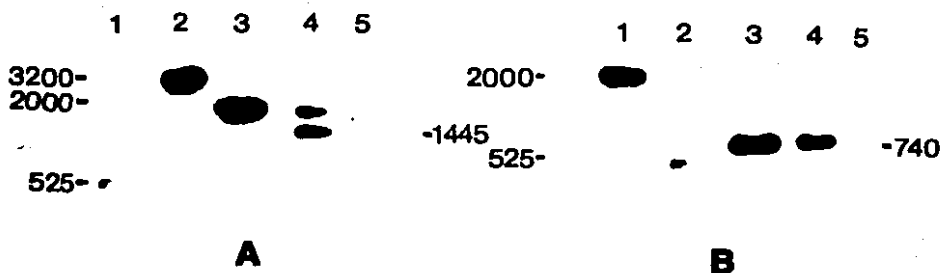


Figura 3.-

Autoradiografía de hibridación tipo Southern utilizando como sonda el oligo 3 (ver figura 2). Se muestran digestiones del DNA total extraído de *C. tetani*. Carril 1 DNA control lambda/Hind III; carril 2, digestión con Bam HI; carril 3, digestión con Hind III; carril 4, digestión con Bgl II; carril 5, digestión con Eco RI.



**Figura 4.-**

Autoradiografía de hibridación tipo Southern de digestiones dobles o sencillas del DNA total de *C. tetani*. Se utilizó como sonda el oligo 1 (ver figura 2). En la parte A de la figura: carril 1, digestión doble con Bgl II/Hpa II; carril 2, digestión con Bgl II; carril 3, digestión con Eco RI; carril 4, digestión doble con Eco RI/Bgl II; carril 5, DNA control lambda/Hind III. En la parte B de la figura: carril 1, digestión con Eco RI; carril 2, digestión doble con Bgl II/Hpa II; carril 3, digestión doble con Eco RI/Hpa II; carril 4, digestión con Hpa II; carril 5, DNA control lambda/Hind III. Se muestra el tamaño de los fragmentos producidos.

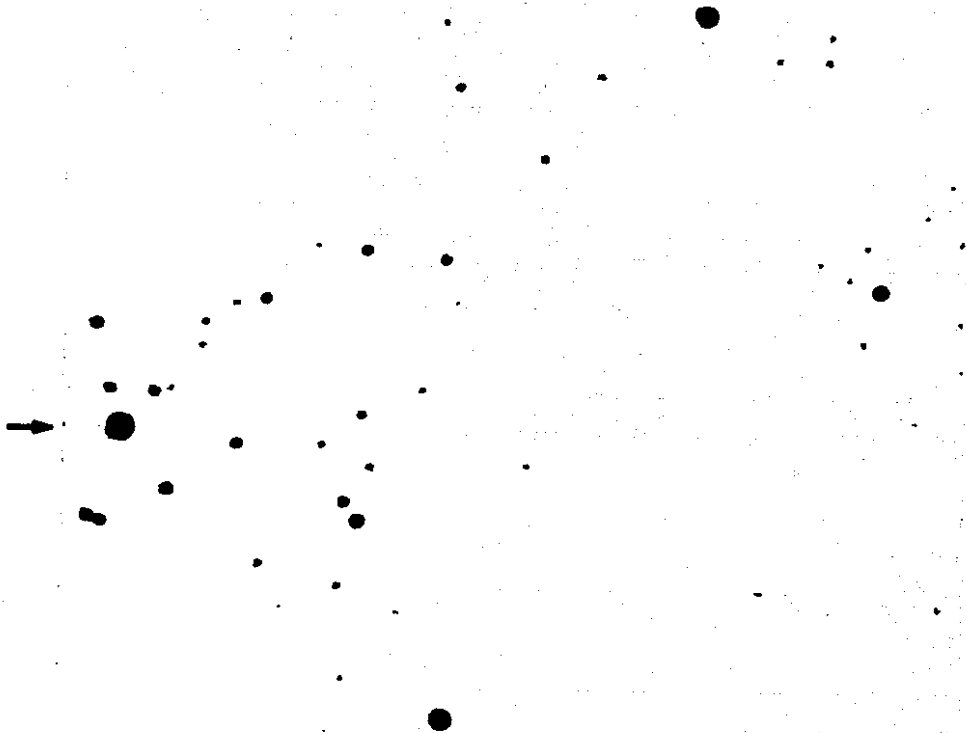


Figura 5.-

Autoradiografía de la hibridación en colonia. Se utilizó como sonda el oligo 2 (ver figura 2). La flecha señala una colonia positiva que podía ser tomada directamente.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

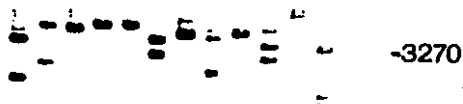


Figura 6-a.-

En la parte A de la figura: se muestra la fotografía del gel teñido con bromuro de etidio, y transferido a nitrocelulosa para las hibridaciones mostradas en la siguiente figura.

Las muestras de la figura corresponden a DNA plásmido purificado de colonias en forma aislada alrededor de la colonia señalada con una flecha en la figura 5. El DNA del plásmido de esta colonia se encuentra en el carril 2 y 8. Del carril 1 al 6 son digestiones con Eco RI y del carril 7 al 12 son digestiones con Acc I. El carril 13 contiene DNA lineal del vector de clonación como control.

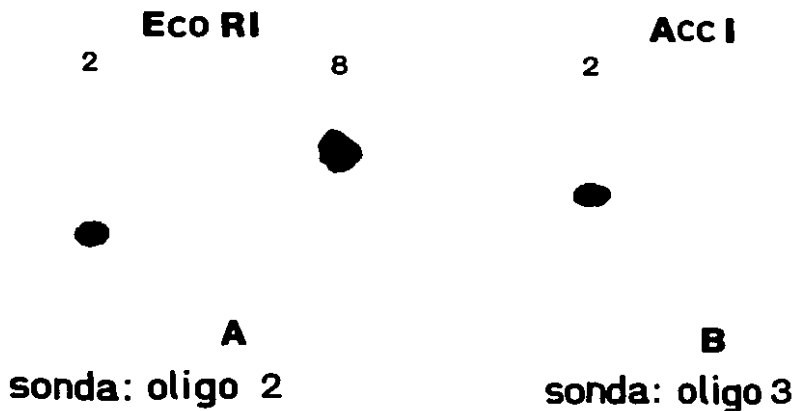


Figura 6-b.-

Autoradiografías de las hibridaciones de las muestras de la figura anterior utilizando dos sondas diferentes hibridadas en forma separada a la misma membrana. La autoradiografía de la izquierda se obtuvo usando como sonda de hibridación al oligo 2. En la parte de la derecha se muestra la autoradiografía obtenida al usar como sonda el oligo 3. Después de la hibridación con el oligo 2, la membrana se lavó en agua hirviendo para eliminar la sonda utilizada y posteriormente se efectuó la segunda hibridación.

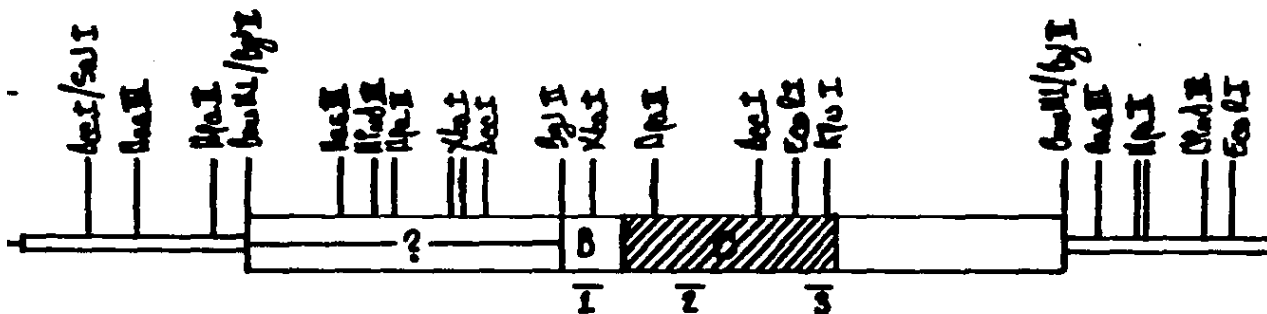


Figura 7.-

Mapa aproximado de una clona positiva determinado a partir de los resultados mostrados en figuras anteriores y de un mapeo mas fino (no mostrado) que incluye digestiones con enzimas con multiples sitios de reconocimiento. Las barras muestran la posición aproximada donde reconocen los oligos utilizados en los diferentes experimentos de hibridación. La parte sombreada de la figura corresponde a la región que codifica para el fragmento C de la toxina. Existe una región desconocida 5' del inserto deseado. Ver texto para la posible procedencia de esta región.



GENOMA DE *C. Tetani*

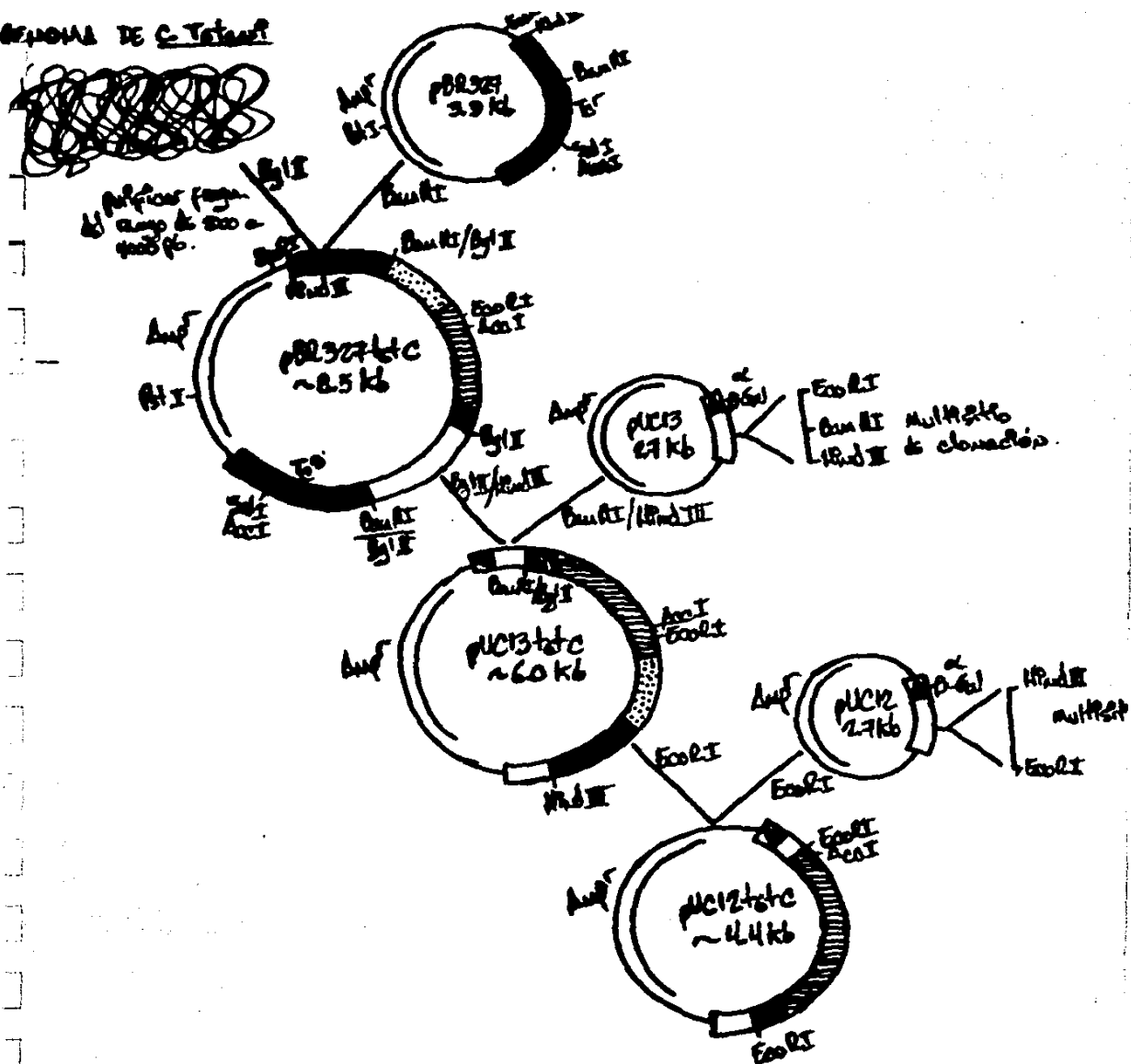


Figura 8-A.-

Esta figura es un resumen de los diferentes pasos efectuados para la construcción del vector de expresión utilizado. Todos los eventos de clonación mostrados se realizaron con los fragmentos de DNA purificados por gel de agarosa. La región con líneas horizontales corresponde al fragmento C de la toxina tetánica; la región con líneas verticales corresponde a la porción de fragmento B discutida en el texto; la región punteada corresponde a la porción de DNA no perteneciente al gene de la toxina y que se encuentra hacia el extremo 3' del gene; la región blanca pertenece a la porción desconocida discutida en el texto.

pUC12tetC fuera de fase:

ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG CCC GGG GAT CTT TAG AAT ATC AAG

Multisitio de Clonación                      Frag. B/C

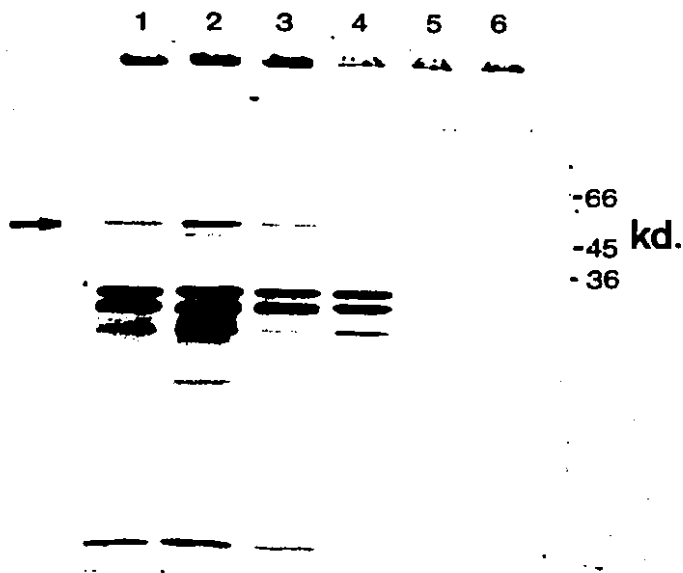
pUC12tetC en fase:

ACC ATG ATT ACG AAT TAA TTC GAG CTC GCC CGG GGA TCT TTA GAA TAT CAA

Eco RI reparado                      Frag. B/C

Figura 8-B.-

En esta figura se muestra la secuencia nucleotídica predicha a partir de los datos de secuencia nucleotídica de la toxina y de las diferentes manipulaciones efectuadas para construir el vector de expresión en pUC12. La parte inferior es para indicar que la reparación, mediante polimerización con fragmento Klenow, en el sitio de restricción para la enzima Eco RI deja una fase abierta de lectura entre los primeros aminoácidos del péptido alfa para complementación de B-galactosidasa y la región que codifica para el fragmento B (y C).



**Figura 9.-**

Autoradiografía de un ensayo de síntesis de proteínas en minicélulas utilizando <sup>35</sup>S-metionina como marcador radiactivo. La flecha señala el producto cuyo peso molecular es aproximado al esperado para el fragmento C de la toxina. El carril 1, contiene proteínas de minicélulas con el vector de expresión en fase de lectura; los carriles 2 y 3, con vector en fuera de fase; carril 4, con vector de expresión sin inserto; carriles 5 y 6, proteínas de minicélulas sin ningún vector de expresión. En el extremo derecho de la figura se muestran marcadores de peso molecular.

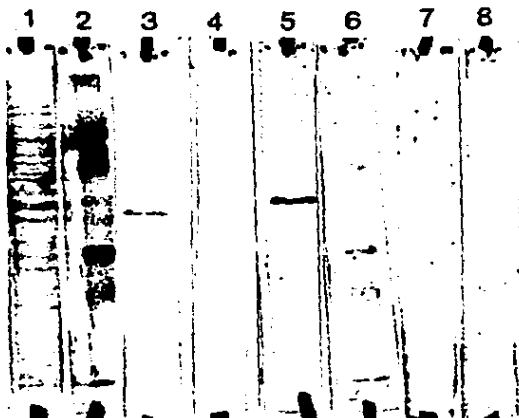
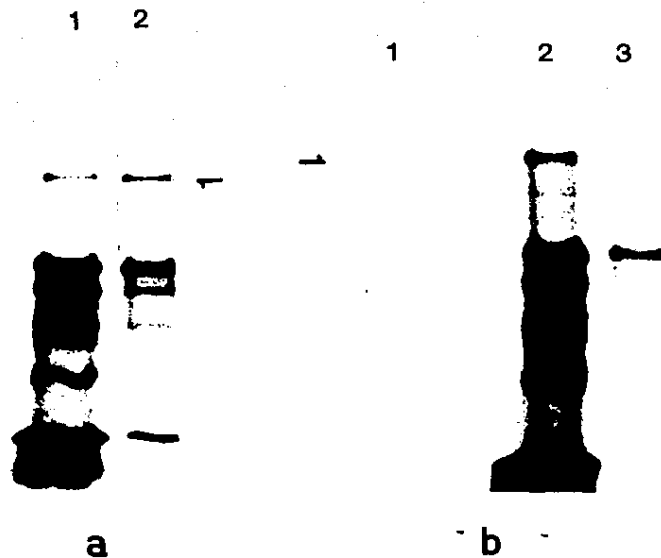


Figura 10.-

Inmunoreacción de proteínas obtenidas de minicélulas con anticuerpos dirigidos contra el fragmento C (c1 y c2) o B (b1) de la toxina. Se utilizó una dilución 1:100 de los anticuerpos. Las minicélulas usadas contienen el plásmido pUC12 con el inserto en orientación correcta y en fase de lectura con los primeros aminoácidos del péptido alfa de complementación de B-galactosidasa. Los carriles marcados con M tienen marcadores de peso molecular como control. Las primeras dos tiras se tñeron con tinta india como control. La tira 3, muestra una reacción con el anticuerpo c1; en la tira 5, se muestra una reacción con el anticuerpo c2; y en la tira 7, la reacción con el anticuerpo b1.



**Figura 11.-**

Inmunoprecipitaciones. Para la parte A de la figura se utilizaron muestras no pre-adsorbidas de las proteínas provenientes de un ensayo de minicélulas y la inmunoprecipitación se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal utilizado clínicamente como antisuero tetánico (carril 2); el carril 1 corresponde a una muestra sin tratar. Para los experimentos mostrados en la parte B los sueros fueron pre-adsorbidos con proteínas totales extraídas de *E. coli*. La exposición autoradiográfica fué de 15 días. La flecha indica el producto esperado a inmunoprecipitar. El carril 1 corresponde a la inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal; el carril 2 son muestras sin tratar; y el carril 3 es una inmunoprecipitación control de las proteínas producidas con el vector de expresión sin inserto. Las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos monoclonales fueron muy deficientes y no se muestran.

## REFERENCIAS

- 1).- Bio/technology 5:1154 (1997).
- 2).- Bio/technology 3:739 (1985); Science 234:1349 (1986);  
Science 238:1065 (1987); Mundo Cientifico 6:816 (1988).
- 3).- Science 235:1059 (1987); Nature 330:106 (1987); Nature  
330:168 (1987); P.N.A.S. 84:4249 (1987); P.N.A.S. 85:1610  
(1988); P.N.A.S. 85:1662 (1988).
- 4).- Bio/technology 5:1041 (1987); Nature 332:287 (1988).
- 5).- J. Biol. Chem. 252:194 (1977).
- 6).- Libro: Bacterial Protein Toxins, Editores: J.C. Alouf, F.J.  
Fehrenbach, J.H. Freer y J. Jeliaszewicz. pag. 421 (1984).
- 7).- Nature 324:76 (1986); F.E.B. 242:254 (1989).
- 8).- Libro: Bacterial Protein Toxins, Editores: J.C. Alouf, F.J.  
Fehrenbach, J.H. Freer y J. Jeliaszewicz. pag. 403 (1984).
- 9).- T.I.B.S. 11:314 (1986).

- 10).- J. Biol. Chem. 253:125 (1978).
- 11).- Gene 19:259 (1982).
- 12).- Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:262 (1986).
- 13).- J. of Infect. Diseases 142:623 (1980); Science 224:881 (1984).
- 14).- J. Bact. 165:21 (1986); E.M.B.O. J. 5:2495 (1986).
- 15).- Infect. and Immunity 55:2541 (1987).
- 16).- P.N.A.S. 57:321 (1967).
- 17).- Libro: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Editores T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook (1982).
- 18).- P.N.A.S. 69:2110 (1972).
- 19).- Libro: Recombinant DNA Techniques: An Introduction. Rodriguez y Tait (1983).
- 20).- J. Mol. Biol. 98:507 (1975).
- 21).- N.A.R. 10:755 (1982).

22).- Nature 227:680 (1970).

23).- Cell 10:521 (1977).

24).- P.N.A.S. 76:4350 (1979).

25).- J. of Chem. Biol. 86:712 (1980).

26).- P.N.A.S. 74:5463 (1977).