

N° 93A  
JES.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS DE PEPTIDOS DE PORINAS DE**  
**Salmonella typhi**

**T E S I S**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO**  
**B I O L O G O**  
**NATALIA MARTIN OROZCO**

MEXICO, D. F. 1992.

**FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE

|  | Pags |
|--|------|
| 1. RESUMEN   | 9    |
| 2. INTRODUCCION  | 10   |
| 3. GENERALIDADES   | 12   |
| 3.1. FIEBRE TIFOIDEA                                       | 12   |
| 3.2. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA                         | 13   |
| 3.2.1. Porinas   | 15   |
| 3.2.2. Antigenicidad de las PME                            | 18   |
| 3.3. EPITOPOS  | 21   |
| 3.4. METODOS DE PREDICCION DE EPITOPOS                     | 24   |
| 3.4.1. Algoritmos de predicción                            | 24   |
| 3.4.2. Predicción de epitopos de T                         | 26   |
| 3.4.3. Predicción de epitopos de B                         | 28   |
| 3.5. PEPTIDOS SINTETICOS                                   | 29   |
| 3.6. SINTESIS EN FASE SOLIDA                               | 31   |
| 3.6.1. Principios básicos de la síntesis<br>en fase sólida | 32   |
| 4. OBJETIVOS   | 39   |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL                                      | 39   |
| 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES                                | 39   |
| 5. MATERIAL Y METODOS                                      | 40   |
| 5.1. PREDICCION DE EPITOPOS                                | 40   |
| 5.1.1. Predicción de epitopos de T                         | 40   |
| 5.1.1.1. Patrones de Rothbard                              | 42   |
| 5.1.2. Predicción de epitopos de B                         | 42   |

|  |    |
|--|----|
| 5.2. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA<br>DE LOS SEGMENTOS ANTIGENICOS | 45 |
| 5.3. ANALISIS DEL ROMPIMIENTO CON BROMURO<br>DE CIANOGENO                      | 45 |
| 5.4. SINTESIS EN FASE SOLIDA   | 46 |
| 5.5. PURIFICACION  | 51 |
| 5.6. ANALISIS DE AMINOACIDOS   | 51 |
| 5.6.1. Hidrólisis  | 51 |
| 5.6.2. Derivados de o-ftaldehído   | 52 |
| 6. RESULTADOS  | 53 |
| 6.1. SEGMENTOS ANFIPATICOS   | 53 |
| 6.2. BUSQUEDA DE PATRONES DE ROTHBARD  | 53 |
| 6.3. SEGMENTOS HIDROFILICOS  | 54 |
| 6.4. SEGMENTOS FLEXIBLES   | 54 |
| 6.5. SINTESIS EN FASE SOLIDA   | 62 |
| 6.5.1. Características del producto crudo                                      | 64 |
| 6.6. PURIFICACION  | 64 |
| 6.7. ANALISIS DE AMINOACIDOS   | 64 |
| 7. DISCUSION DE RESULTADOS   | 68 |
| 8. CONCLUSIONES  | 73 |
| 9. BIBLIOGRAFIA  | 75 |

## PRINCIPALES ABREVIATURAS

|                  |  |
|------------------|--|
| ACN              | acetonitrilo   |
| B                | coeficientes de temperatura atómica o factores Debye-Waller.                     |
| CPH              | complejo principal de histocompatibilidad  |
| <B>p             | promedio de los valores de B.  |
| DCC              | diciclohexilcarbodimida.   |
| DL <sub>50</sub> | dosis letal al 50 %.   |
| DMAP             | dimetilaminopiridina.  |
| DMF              | dimetilformamida.  |
| Dp               | constante de variación entre proteínas.  |
| ELISA            | ensayo inmunoenzimático en fase sólida.  |
| Fab              | fragmento de las inmunoglobulinas que se une al antígeno.                        |
| Ffea             | fluorofenilalanina.  |
| Fmoc             | flurenilmtoxycarbonilo.  |
| HOBT             | hidroxibenzotriazol.   |
| HPLC             | cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés).             |
| Ig               | inmunoglobulina.   |
| kD               | kilodaltones.  |
| LPS              | lipopolisacárido.  |
| NIH              | cepa de ratones del Instituto Nacional de Salud, EUA. (por sus siglas en inglés) |
| nm               | nanómetros.  |
| Omp              | proteína de membrana externa (por sus siglas en                                  |

inglés).

|               |  |
|---------------|--|
| <b>OPA</b>    | orto-ftaldehído.   |
| <b>Pho E</b>  | proteína de membrana externa inducible a concentraciones bajas de fosfatos.              |
| <b>PME</b>    | proteínas de membrana externa.   |
| <b>PCGENE</b> | paquete computacional de programas que analizan secuencias de aminoácidos y nucleótidos. |
| <b>SDB</b>    | dodecil sulfato de sodio.  |
| <b>TFA</b>    | ácido trifluoroacético.  |
| <b>t-Boc</b>  | terbutoxicarbonilo.  |

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Envoltura celular de las bacterias gram-negativas.
- Figura 2 Modelo estructural de la porina Pho E de Escherichia coli.
- Figura 3 Tipos de epitopos.
- Figura 4 Determinante antigénico reconocido por linfocitos T.
- Figura 5 Esquema de síntesis en fase sólida.
- Figura 6 Soporte sólido de la síntesis de péptidos.
- Figura 7 Desprotección de aminoácidos.
- Figura 8 Esquema de síntesis con soporte de poliacrilamida y derivados Fmoc.
- Figura 9 Curva estimativa del porcentaje de unión del primer aminoácido.
- Figura 10 Control de la síntesis de péptidos.
- Figura 11 Perfil de hidrofiliicidad de la secuencia Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.
- Figura 12 Perfil de flexibilidad de la secuencia Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.
- Figura 13 Esquema de péptidos.
- Figura 14 Seguimiento de la desprotección. Liberación de los grupos Fmoc.
- Figura 15 Cromatograma de purificación del péptido DDKGSDGD.
- Figura 16 Análisis de aminoácidos con derivados o-ftaldehído.
- Figura 17 Perfiles de estructura secundaria de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.

## INDICE DE TABLAS

- Tabla 1** Segmentos anfipáticos de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d predichos por el programa AMPHI. Cómputo realizado con ventana de once aminoácidos.
- Tabla 2** Segmentos anfipáticos de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d predichos por el programa AMPHI. Cómputo realizado con ventana de siete aminoácidos.
- Tabla 3** Patrones de Rothbard de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.
- Tabla 4** Segmentos hidrofílicos de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.
- Tabla 5** Segmentos flexibles de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.
- Tabla 6** Lecturas de absorbancia de las fracciones colectadas durante la desprotección.
- Tabla 7** Tiempos de retención de estándares de aminoácidos.
- Tabla 8** Tiempos de retención del análisis de aminoácidos.

## 1. RESUMEN

Con el objetivo de identificar regiones antigénicas de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12, Vi:d, se analizó ésta mediante algoritmos de predicción de epitopos de linfocitos B y T.

Las secuencias elegidas como epitopos de B fueron 46-53 DDKGSDGD y 307-313 QSKGKDI, y como epitopos de T fueron 27-46 KDGKLDLDFGKVDGLHYFSD Y 306-324 LQSKGKDISNGYGSYGDQ. Estos últimos contienen epitopos de B y presentan además patrones de Rothbard. Las regiones elegidas posiblemente correspondan a zonas de la porina expuestas al medio externo acuoso.

Se sintetizó en fase sólida el péptido 46-53 DDKGSDGD, empleando la química de los derivados Fmoc, obteniéndose un rendimiento de 10%. El péptido se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se verificó su composición mediante un análisis de aminoácidos utilizando derivados de orto-ftaldehído (OPA).

Estos péptidos pueden caracterizarse por ensayos inmunológicos de manera que sirvan para identificar los mecanismos involucrados en la protección contra la infección por Salmonella typhi.

## 2. INTRODUCCION

Las porinas (Omp C, Omp D, Omp F y Pho E) son las principales proteínas de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Con anterioridad se ha estudiado la inmunogenicidad de las porinas de Salmonella typhi y se ha demostrado su capacidad protectora en el modelo murino (26,27,29).

La vacunación de ratones de la cepa NIH (National Institute of Health) con proteínas de membrana externa (PME) así como con porinas de Salmonella typhi 9,12 Vi:d, en dosis de 10  $\mu$ g, protegió al 100% de la población en estudio contra el reto de 500 DL<sub>50</sub> de la bacteria viva (26,29).

Anticuerpos monoclonales antiporinas, de isotipo IgM, confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub> (27,30), en el mismo modelo.

Un fragmento de las porinas derivado de la digestión con BrCN, con un peso aproximado de 16 kD, fué capaz de inducir proliferación celular *in vitro* de esplenocitos totales, provenientes de ratones NIH inmunizados con PME de Salmonella typhi (35,36).

Por otra parte, pacientes con diagnóstico de fiebre tifoidea generaron anticuerpos de isotipo IgM que reconocían a una PME de 28 kD durante la fase aguda y durante el periodo de convalecencia presentan anticuerpos de isotipo IgG dirigidos contra las porinas (28).

Las porinas muestran capacidad de estimular tanto la respuesta inmune-humoral como la celular provocando un estado de protección contra la infección por Salmonella typhi. El objetivo

de buscar sitios inmunodominantes en estas proteínas, es conocer los mecanismos involucrados en la protección contra la bacteria intracelular, causante de la fiebre tifoidea y que hasta nuestros días sigue siendo un problema importante de salud pública (2).

La caracterización de sitios antigénicos reconocidos por linfocitos B y T se ha venido realizando por varios métodos experimentales; entre éstos se encuentran: fragmentación química o enzimática, ingeniería genética y péptidos sintéticos (46). Esto ha enriquecido una base de datos cuyo análisis nos permitirá conocer, en un futuro, todas las propiedades moleculares de los sitios antigénicos (47).

El objetivo del análisis de la porina Omp C de Salmonella typhi, es la localización de péptidos antigénicos y además representa la introducción de una tecnología de síntesis con derivados Fmoc en resina de poliacrilamida.

### 3. GENERALIDADES.

#### 3.1 FIEBRE TIFOIDEA

La fiebre tifoidea es causada por la ingestión e invasión masiva de Salmonella typhi. Se caracteriza por síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, cefalea y dolor abdominal. Frecuentemente se presenta con exantema transitorio, esplenomegalia y leucopenia. Las complicaciones más importantes incluyen la hemorragia intestinal en el 2 al 8% de los casos y la perforación que se presenta en el 3 al 4%. La tasa de letalidad es alrededor del 1%; sin embargo, en los casos complicados, como niños, ancianos y desnutridos, puede ascender hasta el 30% (1).

En América Latina durante 1990, se presentaron aproximadamente 89,591 casos, que representan una incidencia de 20.8 casos/100,000 habitantes; la incidencia ha llegado a ser hasta de 150 casos/100,000 habitantes en Chile. En México se reportaron 11,078 casos en 1987, con una tasa de 13.64 casos/100,000 habitantes (2).

Es importante señalar que aún se desconoce la naturaleza de los antígenos de Salmonella typhi relacionados directamente con la protección y la respuesta inmune del humano. Las investigaciones encaminadas a identificar tales antígenos han sido numerosas; la mayoría dirigidas hacia el estudio de los antígenos presentes en la superficie bacteriana, tales como el somático "O" (endotoxina o lipopolisacárido), el flagelar "H" y el capsular "Vi".

Otro componente, de antigenicidad poco estudiada que forma

parte de la membrana externa, es la lipoproteína de Braun.

### 3.2 PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA: PORINAS

Las proteínas de membrana externa de Salmonella typhimurium y Escherichia coli fueron clasificadas en proteínas principales y menores (3,4). Las proteínas principales pueden estar expresadas con más de 100 000 copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo, generalmente sólo se expresan cinco. Dentro de las proteínas principales se encuentran:

1) Proteínas matrices o porinas (OmpC, OmpD, OmpF, Pho E), que intervienen en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana (5);

2) Proteína modificable por el calor (OmpA), involucrada en los procesos de conjugación y que actúa como receptor para fagos y colicinas (6,7) y

3) Lipoproteína de Braun, la cual está unida covalentemente a la peptidoglicana y cuya función es la de mantener la integridad estructural y funcional de la membrana (8).

Con respecto a las proteínas menores se ha demostrado que ellas intervienen como acarreadores en el transporte de sustancias de alto peso molecular y que están relacionadas con la división celular. Entre ellas se encuentra la única proteína de membrana externa que tiene actividad de fosfolipasa A (3,4,5). (Figura 1)

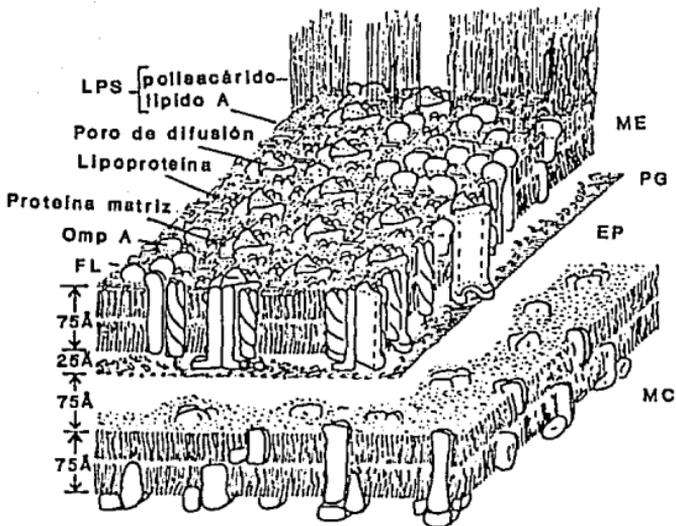


Figura 1. Envoltura celular de las bacterias gram negativas. Abreviaturas: FL, fosfolípidos; ME, membrana externa; PG, peptidoglicano; EP, espacio periplásmico; MC, membrana citoplasmática; LPS, lipopolisacárido.

Tomado de 3.

### 3.2.1 Porinas

La porinas son nonámeros de peso molecular de 28000 a 48000 daltones, están presentes en la membrana como oligómeros (usualmente trímeros). Se encuentran asociados estrechamente a la peptidoglicana y al LPS de forma no covalente. Los trímeros se agregan en forma natural formando poros o canales (forma biológicamente activa) que permiten la entrada pasiva inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias gram negativas (9).

Las porinas son polipéptidos de 336 residuos en promedio, su composición de aminoácidos indica una moderada hidrofobicidad y un índice de polaridad de 45% (10), con un punto isoeléctrico de alrededor de 4.5. Tienen un alto contenido de estructura beta-plegada lo cual las hace estables al dodecil sulfato de sodio (SDS).

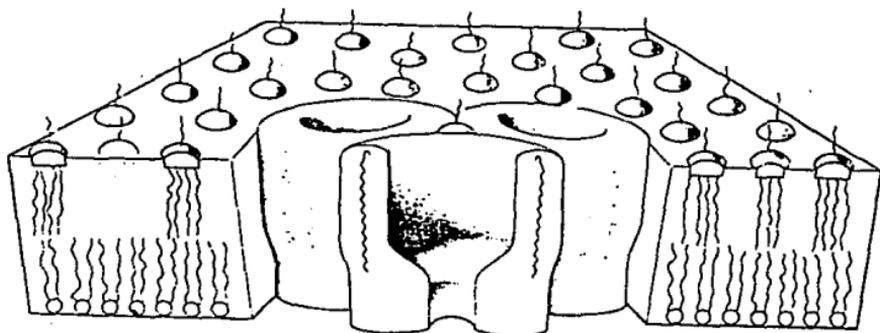
En 1980 Garavito y Rosenbusch reportaron la estructura de la porina Omp F de Escherichia coli, a partir de cristales, con una resolución de 3.8 Å. El análisis por difracción de rayos X muestra que el esqueleto de la porina está arreglado en hojas antiparalelas como barriles beta o emparedados de beta plegadas de 40 Å de longitud. El segmento transversal es de 10 a 12 aminoácidos y contiene aminoácidos polares orientados de forma perpendicular al plano de la membrana (11).

El modelo de Jap (1989) para la porina Pho E de Escherichia coli consiste en una estructura cilíndrica formada por los tres

poros o canales que convergen al atravesar la membrana, asociados fuertemente por interacciones proteína-proteína. Tiene un vestíbulo acuoso elíptico de 35 Å de largo. En el centro del cilindro, eje donde convergen los tres canales, se encuentra asociado el lipopolisacárido con seis cadenas de ácidos grasos en un espacio de 10 Å (12). (Figura 2)

Una parte del interior del canal de porinas (poro de difusión hidrofílico con un diámetro promedio de 1.5-2.0 nm. (3)), se encuentra revestido por aminoácidos cargados, y el número y posición de estas cargas determina la selectividad iónica de los canales, que puede darse para simples cationes o aniones y para moléculas como antibióticos de diferente carga (13). La incorporación de los poros de proteínas dentro de la capa lipídica aumenta la conductancia a través de la membrana y se ha encontrado que los canales pueden existir en forma abierta o cerrada, estableciendo un equilibrio unos con otros, lo que ha sugerido que la abertura de estos poros es un fenómeno cooperativo (14).

La relativa abundancia de estas proteínas depende de una eficiente regulación de la actividad osmótica del medio de desarrollo y de la temperatura; así, el crecimiento a altas y bajas concentraciones de sal favorecen la producción de las porinas Omp C y Omp F, respectivamente. La alta osmolaridad disminuye la producción de Omp F, que es cuantitativamente compensada con la síntesis de más proteína Omp C. Por otro lado, la porina Pho E es producida sólo bajo limitaciones de fosfato.



**Figura 2. Modelo estructural de la porina Pho E de Escherichia coli. Modelo propuesto por Jap en 1989 basado en estudios de cristalografía electrónica con una resolución de 18 Å. Tomada de 12.**

El diámetro de poro de Omp F es de 1.08 nm y su canal es más largo que el de Omp C. Omp F y Omp C muestran preferencia por cationes y Pho E por aniones que atraviesen selectivamente su canal. Las secuencias de Pho E y Omp F tienen un 63 % de homología en cuanto a identidad de aminoácidos y un 80% de identidad funcional.

La fisiología de las porinas como canales posiblemente se justifica como un medio de supervivencia de las bacterias en el ambiente del hospedero, rico en detergentes como las sales biliares. De manera que las porinas son ideales para repeler estos compuestos hidrofóbicos cargados negativamente.

### 3.2.2. Antigenicidad de las PME.

Debido a la localización de las proteínas de membrana externa (PME) en la superficie de las bacterias gram-negativas, se consideran como antígenos en la inducción de protección.

Frasch y cols. encontraron que las PME de Neisseria meningitidis grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos. Los anticuerpos anti-PME presentaron actividad bactericida *in vitro* mediada por complemento (15).

Buchanan y Arko demostraron que el antígeno capaz de proteger a chimpancés contra la uretritis gonocócica estaba presente en la membrana externa de Neisseria gonorrhoeae (16). Posteriormente, demostraron que las proteínas de dicha membrana eran las que conferían protección específica en cobayos a los que se había

inducido una infección gonocócica experimental (17).

Kussi y cols. demostraron que las porinas extraídas de una cepa rugosa de Salmonella typhimurium protegían al ratón de un reto con una cepa lisa homóloga. El mismo efecto se obtuvo en forma pasiva con anticuerpos específicos (18,19).

La inmunización con PME derivados de otras bacterias gram-negativas, como Haemophilus influenzae (20), Shigella flexneri (21), y Pseudomonas aeruginosa (22) confieren protección contra la infección en animales experimentales. Inclusive se ha elaborado una vacuna a base de PME de Neisseria gonorrhoeae (23).

En pacientes se han detectado anticuerpos que reconocen a las PME tanto en fase aguda como en la fase convaleciente, de infecciones causadas por bacterias gram negativas como Haemophilus influenzae (20), Neisseria meningitidis (24), y Clamidia trachomatis (25).

Isibasi y cols. estudiaron la capacidad de las PME de Salmonella typhi 9,12,Vi:d de conferir protección al ratón contra el reto de la bacteria viva (26). Demostraron que tanto las PME de Salmonella typhi, como el suero de conejo anti-PME inducen en el ratón un estado de inmunidad protectora. Además el suero empleado para la protección pasiva, reconoce por inmunoelectrotransferencia a las porinas de las diferentes cepas de Salmonella utilizadas en el estudio (27).

La evaluación de la respuesta inmune humoral hacia las PME de Salmonella typhi en pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda y en fase de convalecencia mostró que las PME son inmunogénicas en

el humano, pues se encontraron anticuerpos de clase IgM e IgG, estos últimos dirigidos contra las porinas (28).

La inmunización con cantidades tan pequeñas como 5  $\mu$ g de porinas de Salmonella typhi, purificadas por el método de Nikaido, confirieron protección al 80 % de los ratones NIH retados con 500 DL<sub>50</sub> de la bacteria homóloga, pero no se indujo protección al reto con Salmonella typhimurium en las mismas condiciones (27,29).

Anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas de S. typhi 9,12, Vi:d confirieron una protección del 60% al reto con 20 DL<sub>50</sub> (30). Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido (LPS) no produjeron ningún efecto; esto corrobora que las porinas son inmunógenos protectores en el modelo murino (31).

La vacunación de ratones NIH con 30  $\mu$ g de PME de S. typhi, indujo respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos, en presencia de porinas de Salmonella typhi, Salmonella typhimurium y Escherichia coli (32).

La respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos de ratones NIH inmunizados con PME de S. typhi persistió hasta tres meses después de la inmunización y no se debió a la presencia de LPS (33).

La inmunización de ratones C57Bl/6 con PME de S. typhi indujo una respuesta proliferativa *in vitro* específica de linfocitos T (33).

La administración de vacuna antitifoídica oral indujo, en las personas estudiadas, la producción de anticuerpos anti-porinas cuantificados por el método de ELISA (34).

Un fragmento de las porinas, derivado de la digestión con BrCN y con un peso aproximado de 16 kD, indujo una respuesta proliferativa *in vitro* de esplenocitos totales, provenientes de ratones NIH inmunizados con PME de S. typhi 9,12 Vi:d (35,36).

### 3.3. EPITOPOS

La antigenicidad de una proteína reside en una parte restringida de la molécula conocida como determinante antigénico o epitopo. Esta región está accesible en la superficie de la molécula y es reconocida por los paratopos o sitios de unión específico de una molécula de anticuerpo. Los paratopos están presentes en los extremos de cada uno de los dos Fab de los anticuerpos y consisten en regiones hipervariables de residuos que se unen al antígeno (37).

Los tipos de epitopos se han clasificado en función de su unión con el paratope en (38) (Figura 3):

1.- Epitopos continuos que consisten en fragmentos lineales de residuos.

2.- Epitopos discontinuos que consisten en residuos no contiguos en secuencia pero unidos en la superficie de la proteína debido al plegamiento de la cadena polipeptídica.

En cuanto al número de epitopos que puede haber en una proteína hay dos teorías:

1.- Una proteína contiene pocos epitopos discretos situados en una superficie altamente accesible y el resto de la molécula no es antigénica o no posee antigenicidad.

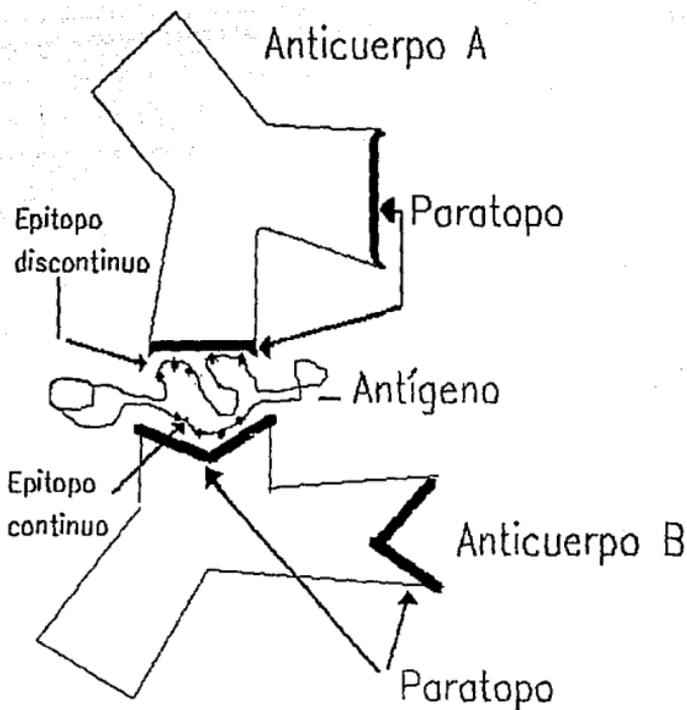


Figura 3. Tipos de epitopos. La figura muestra en un mismo antígeno a un epitopo continuo y a uno discontinuo, reconocidos por distintos anticuerpos. Tomada de 38.

2.- Toda la superficie accesible de la molécula es un conjunto de epitopos que se traslapan, potencialmente capaces de unirse con su apropiado paratopo. El que un epitopo sea capaz de provocar una respuesta de anticuerpos en un individuo dependerá de factores genéticos de éste como son el repertorio genético de inmunoglobulinas, la tolerancia y otros mecanismos reguladores (39).

Generalmente los epitopos de B corresponden a secuencias discontinuas. Datos estructurales cristalográficos establecen que los epitopos en las proteínas nativas consisten en 15 a 22 residuos en un arreglo discontinuo. Sin embargo, cálculos energéticos sugieren que es un péptido de 5 a 6 aminoácidos el que contribuye con la más alta energía de unión, al complejo antígeno-anticuerpo, y los demás residuos solo contribuyen a la complementaridad (40).

El estudio a futuro de las estructuras de los epitopos debe considerar su estructura nativa así como las interacciones con el anticuerpo. El análisis cristalográfico de un péptido de 19 aminoácidos proveniente de la miohemeritina muestra una configuración de hoja plegada en el nicho del anticuerpo y en forma nativa corresponde a una región de alfa hélice (41).

La mayoría de los epitopos de T son secuencias lineales intactas de la proteína. Los linfocitos T cooperadores reconocen al antígeno procesado y presentado en asociación con una molécula de clase II por la célula presentadora de antígeno (42). Hay dos sitios del antígeno que deben distinguirse, el que se une al receptor del linfocito T (epitopo) y el que interacciona con la

molécula del complejo principal de histocompatibilidad (agretopo), ambos muy cercanos.

Sercaz y cols. (42) han categorizado los péptidos reconocidos por linfocitos T en: inmunodominantes, subdominantes y crípticos; dependiendo de su habilidad para provocar una respuesta proliferativa en linfocitos T, activados previamente con la proteína nativa.

El tamaño mínimo del epitopo necesario para estimular linfocitos T cooperadores o linfocitos T citotóxicos esta entre ocho y doce aminoácidos (42). El epitopo particular reconocido es dependiente de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (43).

### 3.4. METODOS DE PREDICCIÓN DE EPITOPOS

#### 3.4.1. Algoritmos de predicción

Los algoritmos de predicción se han utilizado principalmente para dilucidar la estructura secundaria y terciaria de proteínas partiendo de su secuencia de aminoácidos. Estos han tenido cierto éxito para las proteínas globulares cuya presencia en la base de datos cristalográficos es muy rica. Sin embargo en el caso de proteínas transmembranales, la limitante es el que muy pocas de éstas han sido cristalizadas y analizadas por difracción de rayos X (44). De ahí que se deben tener precauciones con las predicciones en proteínas transmembranales, como es el caso de las porinas.

Para la búsqueda de cualquier estructura en una proteína,

hélices, hojas plegadas, o en nuestro caso sitios antigénicos, se deben conocer las funciones y objetivos de los algoritmos y a la par considerar los datos experimentales y características de la secuencia en estudio. Esto nos permitirá elegir el método adecuado aplicable al caso de predicción. No siempre se pueden usar algoritmos basados en datos de proteínas globulares para proteínas transmembranales (45).

A continuación se señalan algunas de las características generales de los sistemas de predicción (46):

1.- Buscan una propiedad estructural o figura que se relacione con el sitio antigénico.

En este sentido la predicción de sitios de T a partir de una secuencia, es más adecuada que para la de epitopos de B si consideramos que los sitios reconocidos por linfocitos T siempre son fragmentos del antígeno, péptidos, asociados a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad en la superficie de una célula presentadora. Lo cual no involucra el reconocimiento de alguna conformación espacial como en el caso de epitopos de B que reconocen al antígeno en forma nativa.

2.- Evalúan la significancia estadística de la correlación entre esta propiedad y el sitio de estudio. Es decir, para ser útil en predicción no debe aparecer muy frecuentemente en toda la secuencia.

3.- La evaluación del algoritmo se realiza comparando los sitios antigénicos predichos con los sitios reportados como inmunodominantes en una base de datos.

### 3.4.2. Predicción de epitopos de T

La predicción de sitios antigénicos en una proteína reconocidos por linfocitos T se basa en el modelo de la hélice anfipática propuesto por Berzofsky y cols. (1987). Este modelo propone que la porción polar del segmento proteico es reconocida por el receptor del linfocito T y la porción apolar por la molécula del complejo principal de histocompatibilidad de la célula presentadora de antígeno (47) (Figura 4).

Este algoritmo de predicción solo funciona para sitios reconocidos por linfocitos T cooperadores en el contexto de moléculas clase II.

En 1988 Rothbard reporta secuencias encontradas con alta significancia estadística en determinantes antigénicos reconocidos por linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos. Estas secuencias consisten en un patrón lineal compuesto de un aminoácido cargado o glicina, seguido de dos aminoácidos hidrofóbicos (48).

El patrón se identificó por las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, clasificando a los aminoácidos en cargados, hidrofóbicos y polares. Dicha clasificación es arbitraria debido a que se repiten algunos aminoácidos en las diferentes agrupaciones.

Cabe mencionar que el patrón de 4 ó 5 aminoácidos es congruente con el modelo de la hélice anfipática debido a que cada 3.6 residuos corresponden a una vuelta en hélice cuyo arreglo de aminoácidos permite una cara hidrofílica (aminoácidos cargados) y una cara hidrofóbica (aminoácidos hidrofóbicos).

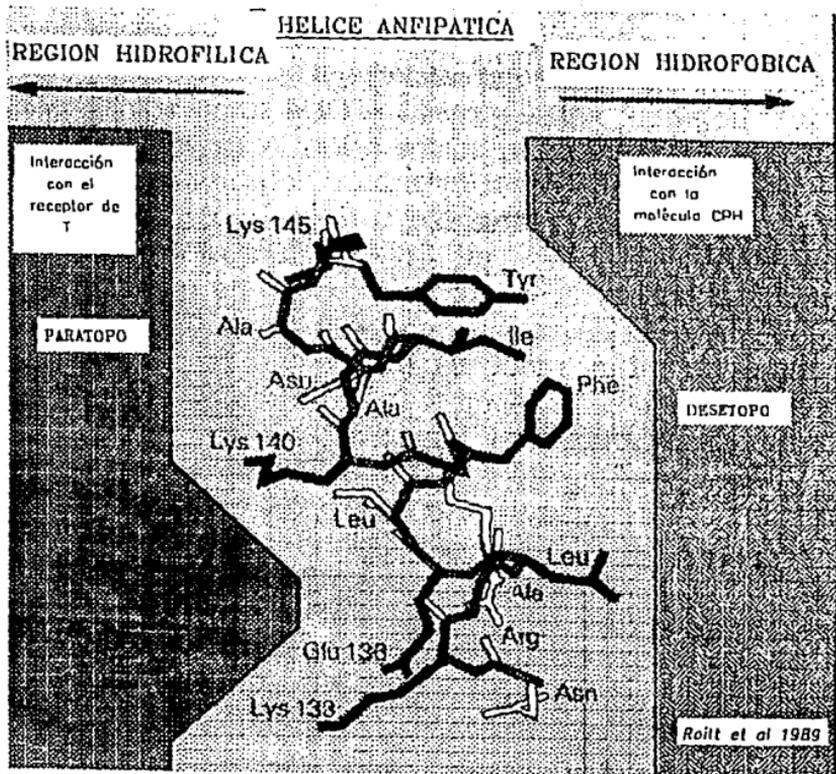


Figura 4. Determinante antigénico reconocido por linfocitos T. Modelo propuesto por Berzofsky y cols. en 1987 (47). Tomada de 50.

La aparición de este patrón en la secuencia primaria no se ve segregada por especies o restringida por clase I o II.

Este patrón aparece tanto en estructuras de alfa hélice como de hojas beta plegadas en proteínas cuya estructura tridimensional ya es conocida. Aunque no se considera dicha estructura en el análisis.

#### **4.4.3. Predicción de epítomos de B**

Los determinantes antigénicos reconocidos por linfocitos B son regiones generalmente expuestas al medio acuoso. Poseen principalmente aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas y cargadas. La predicción de dichos epítomos por el método de Hoop y Woods está basada en estas características. Este método localiza los segmentos de mayor hidrofiliidad de la secuencia y señala la secuencia que puede corresponder o estar adyacente a un sitio antigénico (50).

Los segmentos de alta movilidad local en una proteína se correlacionan con regiones expuestas al medio acuoso y con epítomos continuos de 5 a 10 aminoácidos (51). Lo cual indica que los anticuerpos tienden a reconocer péptidos cortos en regiones móviles de una proteína. La movilidad puede mejorar la complementaridad de las regiones de contacto entre el antígeno y el anticuerpo (38).

El método propuesto por Karplus y Shulz en 1985 busca los segmentos de mayor movilidad en una secuencia para localizar epítomos contínuos (38). La información acerca de la movilidad en

proteínas proviene de estudios de resonancia magnética nuclear (NRM) y estudios cristalográficos a muy alta resolución, se le conoce como factores de B, coeficientes de agitación térmica o valores Debye-Waller, y representan el desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio bien determinado de posiciones (52).

#### 4.5 PEPTIDOS SINTETICOS.

El desarrollo de la síntesis de péptidos ha permitido estudiar parámetros de antigenicidad como son composición química, tamaño, forma, carga y configuración. Así como realizar estudios sobre inmunidad celular, interacciones célula-célula, especificidad en el reconocimiento de los antígenos de linfocitos T y B, tolerancia y restricción genética (42). Se ha visualizado su uso posterior en inmunoterapia para la producción de vacunas sintéticas y anticuerpos monoclonales.

Las limitaciones en el uso sistemático de los péptidos son el costo y el número necesario para realizar una evaluación completa de la secuencia en estudio.

Es importante señalar la diferencia entre antigenicidad e inmunogenicidad de un péptido. La antigenicidad se refiere a la habilidad de una proteína o un péptido de unirse específicamente a un anticuerpo incluso en condiciones *in vitro*, mientras que la inmunogenicidad se refiere a la capacidad del antígeno de provocar una respuesta de anticuerpos. La primera es una característica intrínseca del péptido mientras que la segunda depende de las

funciones de linfocitos B y T cooperadores, del protocolo de inmunización, de la naturaleza de las interacciones entre linfocitos T y B, de la genética del animal inmunizado y de otras características extrínsecas. Los estudios de péptidos sintéticos conjugados con proteínas heterólogas buscan antigenicidad con respecto a las células B, más no inmunogenicidad.

Los péptidos sintéticos pueden provocar una respuesta de anticuerpos, capaces de reconocer tanto al péptido como a la proteína nativa. Se ha observado que anticuerpos monoclonales anti la proteína nativa no reconocen a péptidos relacionados (42).

Anticuerpos dirigidos contra péptidos se han utilizado para detectar cambios conformacionales en proteínas y para la purificación de proteínas recombinantes y/o fusionadas con el péptido en su extremo carboxilo o amino.

Milich clasificó operativamente a los anticuerpos antipéptidos en (42):

a) Antipéptidos que reaccionan con el péptido inmunógeno mas no con la proteína nativa, es decir anticuerpos producidos a partir de péptidos específicos.

b) Antipéptidos que reaccionan con el péptido inmunógeno y con la proteína nativa, pero que no compiten con los anticuerpos producidos al inmunizar con la proteína nativa; es decir aquellos producidos a partir de péptidos únicos.

c) Antipéptidos que reaccionan con el péptido inmunógeno y con la proteína nativa y que compiten con anticuerpos producidos inmunizando con la proteína nativa; es decir aquellos a partir de

péptidos determinante-específicos.

En términos de vacunas sintéticas solo los antipéptidos capaces de neutralizar la infección son de interés, de aquí la búsqueda de péptidos únicos y determinante-específicos.

Idealmente una vacuna sintética debe:

- Contener epitopos continuos y discontinuos capaces de producir una respuesta importante de anticuerpos.

- Contener epitopos de T que sirvan para la producción de una respuesta humoral y celular, previendo una respuesta de memoria relevante en el control del patógeno.

- Ser específica para un patógeno en particular y no producir inmunogenicidad cruzada con antígenos propios.

- Proveer inmunidad prolongada que no requiera de una segunda inmunización.

La limitante en la estrategia de péptidos sintéticos, en cuanto al reconocimiento por linfocitos T, es el hecho de que este proceso involucra a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de fenotipo individual. No todos los individuos responden al mismo sitio de reconocimiento de células T.

#### 4.6 SINTESIS EN FASE SOLIDA

En 1963 Merrifield introduce la síntesis de péptidos en fase sólida, la cual involucra la unión, por medio de un enlace covalente, de aminoácidos protegidos en su extremo alfa-amino a un soporte sólido de carácter insoluble e inerte. Esto permite lavar, filtrar y remover reactivos en exceso y productos secundarios

eliminando pasos intermediarios de purificación (53).

#### 4.6.1. Principios básicos de la síntesis en fase sólida

1) El grupo carboxilo del primer aminoácido se une al soporte sólido por medio de un enlace covalente. Este debe ser estable a lo largo de toda la síntesis.

2) El grupo protector del alfa-amino se elimina bajo condiciones que no afecten los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos.

3) Se realiza la activación del aminoácido siguiente para condensarlo con el alfa amino de aminoácido unido a la resina y formar el enlace amida.

4) Se realizan ciclos de desprotección y acoplamiento hasta obtener la secuencia deseada.

5) Al finalizar la síntesis se desprende el péptido de la resina y se desprotegen las cadenas laterales en un solo paso.

En la síntesis de péptidos de Merrifield (53) el soporte sólido es una resina de poliestireno clorometilada. Los extremos alfa amino de los aminoácidos se protegen con el grupo ter-butoxicarbonilo (t.Boc).

Los grupos protectores son selectivamente eliminados con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano, posteriormente el tratamiento con trietilamina libera al grupo amino dejándolo listo para reaccionar.

La formación del enlace peptídico se realiza por una reacción de acilación con el aminoácido entrante, el cual se activa con la

diciclohexilcarbodimida (DCC).

Los ciclos de desprotección por acidólisis, desprotonación por aminas terciarias y acilación con el siguiente residuo son repetidos hasta que la cadena peptídica se completa .

Al terminar la síntesis, la peptidil resina se separa con ácido fluorhídrico, el cual elimina todos los grupos protectores y corta el péptido de la resina por una reacción de desplazamiento nucleofílico (Figura 5).

En 1970 Shepard y Atherton introducen la estrategia con grupos Fmoc y soporte de poliamidas (54,55,56).

El soporte de poli(dimetilacrilamida) es de carácter más polar que el poliestireno, utilizado en la síntesis de Merrifield, por lo tanto es más compatible en sus propiedades de solvatación con la cadena polipeptídica en crecimiento. A diferencia del poliestireno estos polímeros permiten el paso de solventes orgánicos polares, incluso el agua. Su uso permite que se lleven a cabo la formación del enlace peptídico y las reacciones de desprotección en un medio óptimo independientemente de las propiedades del soporte.

La resina es un copolímero de dimetilacrilamida y ésteres de metilacrililsacarosina entrecruzados por etilén bisacrilamida que le permiten formar macroporos. Se funcionaliza fácilmente por la sacarosina.

La unión de la etilén diamina provee grupos amino libres lo que permite la formación de grupos amida con espaciadores como aminoácidos de referencia y agentes de unión reversible. Estos agentes de unión proveen la formación de un enlace bencil ester

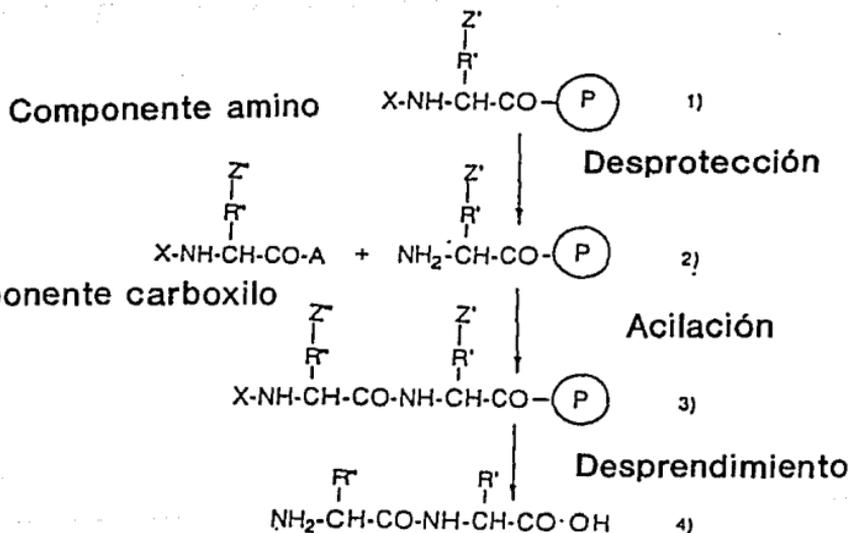


Figura 5. Esquema básico de la síntesis en fase sólida.

Abreviaturas: X, grupo protector; P, soporte sólido;

A, grupo activador del carboxilo; Z, grupo protector de

la cadena lateral.

entre la matriz de la resina y el primer aminoácido del péptido, parecido al de la resina convencional de poliestireno. (Figura 6)

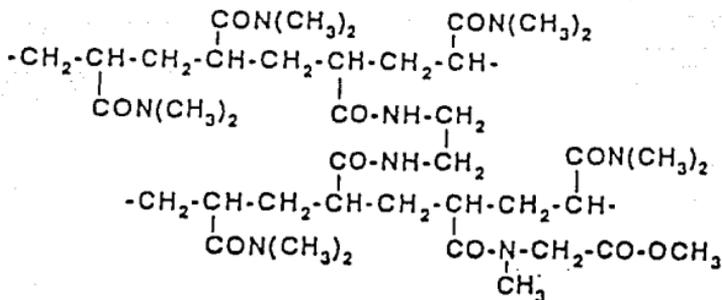
El grupo protector fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), es lábil al tratamiento con bases secundarias de fuerza media como la piperidina. Lo cual elimina el uso de ácidos fuertes durante la síntesis y la posterior neutralización; permitiendo así el uso de otros grupos protectores para las cadenas laterales (derivados terbutilos), lábiles al tratamiento con ácidos. El grupo Fmoc al igual que muchos uretanos reduce la acidez del protón alfa amino, lo que previene la racemización del aminoácido activado. (Figura 7)

La esterificación del primer aminoácido a la resina se lleva a cabo utilizando la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador. Para la desprotección del grupo amino se prefiere utilizar piperidina al 20% en dimetil formamida (DMF).

El hidroxibenzotriazol (HOBT) es el agente activante del aminoácido subsecuente del péptido en formación. Y la separación de la resina como la eliminación de grupos protectores se realiza con una solución de TFA al 95%. (Figura 8)

Las ventajas de este método con respecto al de Merrifield son: a) mayor rendimiento, b) menor tiempo de síntesis y c) eliminación del uso de ácido fluorhídico (HF).

A)



B)

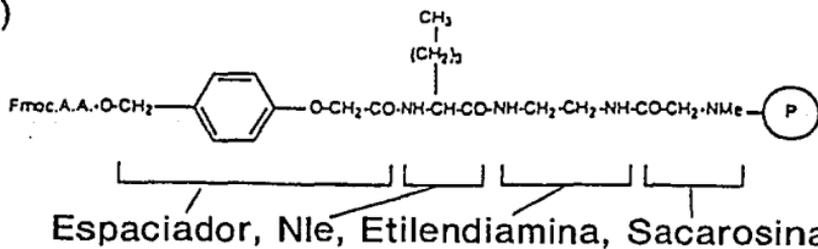
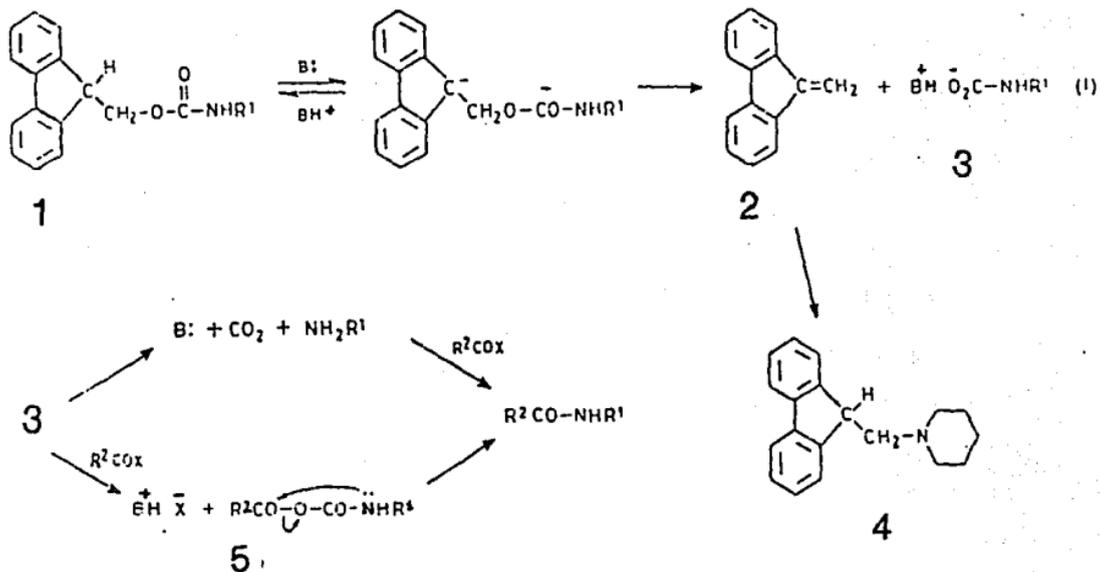


Figura 6. Soporte sólido de la síntesis de péptidos.

a) Estructura base de la resina de polidimetilacrilamida

b) Resina funcionalizada y con el primer residuo.

Abreviaturas: Nle, norleucina; P, polímero de dimetilacrilamida; A.A., aminoácido.



**Figura 7. Desprotección de aminoácidos.** 1. Aminoácido protegido con el grupo Fmoc. 2. Dibenzofulveno. 3. Aminoácido desprotegido. 4. Posible complejo en un exceso de piperidina. 5. Acoplamiento del segundo aminoácido. Abreviaturas: R, residuo; B:, piperidina libre; BH+, piperidina protonada; X, grupo activador del carboxilo. Tomada de 56.

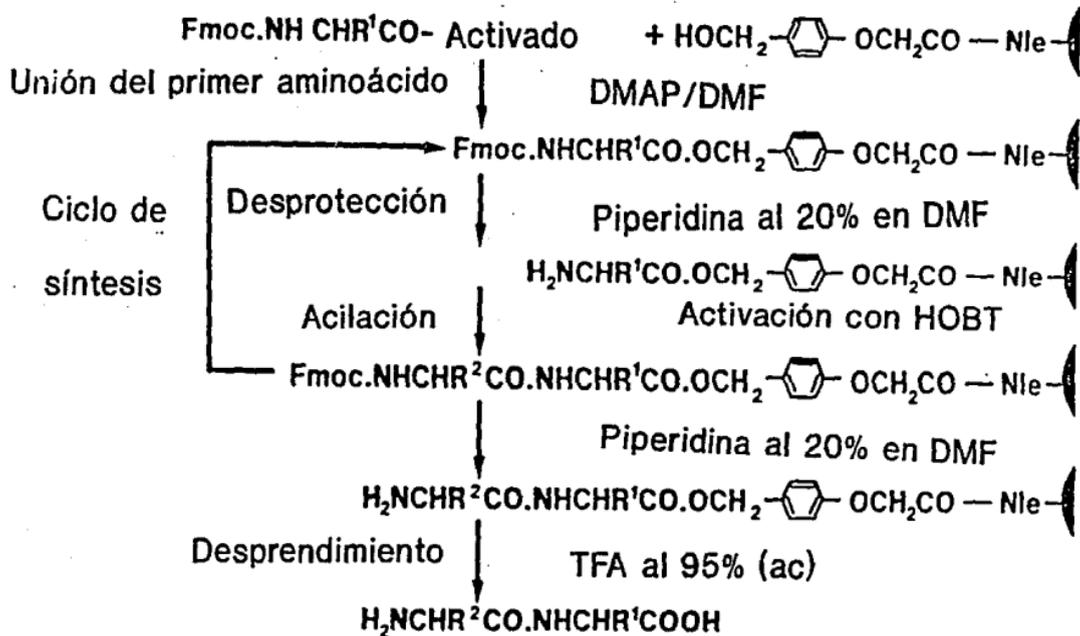


Figura 8. Esquema de síntesis de péptidos con derivados Fmoc y soporte de poliacrilamida. Abreviaturas: DMAP, dimetilaminopiridina; DMF, dimetilformamida; HOBT, hidroxibenzotriazol; TFA, ácido trifluoroacético; R, residuo; Nle, norleucina.

#### 4. OBJETIVOS

##### 4.1. OBJETIVO GENERAL.

Predecir, sintetizar y caracterizar péptidos inmunodominantes de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d.

##### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer y manejar los diferentes algoritmos de predicción de epitopos y comparar los resultados con sitios antigénicos ya reportados para conocer los criterios de elección de secuencias antigénicas.

- Predecir sitios inmunogénicos de la porina OmpC de Salmonella typhi 9,12,Vi;d que puedan ser reconocidos por linfocitos B y T.

- Sintetizar en fase sólida los péptidos predichos utilizando un sintetizador manual empleando derivados Fmoc y un soporte de poliacrilamida.

- Conocer y emplear los métodos de purificación y análisis de aminoácidos utilizando la cromatografía líquida de alta resolución para la caracterización química de los péptidos.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 PREDICCIÓN DE EPITOPOS

Se buscaron epitopos mediante algoritmos de predicción en la secuencia de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d de 378 aminoácidos reportada por Calva y cols. (57,58).

#### 5.1.1. Predicción de epitopos de T

La predicción de epitopos de T se llevó a cabo con el programa AMPHI (47). El cual está escrito en FORTRAN 77 y se ejecuta en una Olivetti M 290 con un sistema operativo MS DOS 5.0. Acepta secuencias hasta de 1000 aminoácidos. Tiene dos opciones de tamaño de bloque de aminoácidos para el análisis: siete y once.

La estrategia utilizada para detectar hélices anfipáticas que corroborara este algoritmo consiste en:

- 1.- Convertir la secuencia de aminoácidos en una secuencia de valores de hidrofobicidad asignados según la escala de Flauchere y Pliska (basada en el coeficiente de partición de los aminoácidos en un sistema octanol-agua).

- 2.- Buscar patrones anfipáticos realizando un análisis por ventanas, por bloques de longitud "l" que se traslapan donde el aminoácido central del bloque es al que se le asigna el resultado del análisis. Una secuencia L contiene  $L - l + 1$  bloques que se traslapan de longitud l.

$$L = L - l + 1 \quad (\text{bloques que se traslapan})$$

Los tamaños de bloque en estudio fueron de siete y once aminoácidos (promedio del tamaño de los sitios reconocidos por linfocitos T).

Este programa asigna un índice anfipático al bloque en estudio que expresa la intensidad anfipática helicoidal dentro de los segmentos elegidos, toma en cuenta la intensidad sobre la longitud del segmento. Esto permite comparar segmentos de varios tamaños e intensidades.

Para validar los sitios antigénicos dentro de los bloques se considera que deben aparecer una vez en el bloque de 11 y dos veces en el bloque de siete.

3.- Buscar periodicidad anfipática que concuerde con la estructura de una hélice. Esto se realiza con una ecuación modificada de la transformada de Fourier ajustada a un senoide por mínimos cuadrados.

4.- Seleccionar hélices estables. Considerando como criterios de estabilidad de hélice que la prolina solo debe aparecer cerca del extremo amino terminal del segmento en cuestión y lisina cerca del extremo carboxilo para validar el segmento que los contiene. Se descartan los sitios glicosilados por que enmascaran los epítomos de T. Además considera que los segmentos adyacentes a la hélice predicha deben ser también helicoidales para estabilizar la estructura.

### 5.1.1.1. Patrones de Rothbard

Se buscaron manualmente los patrones reportados por Rothbard (48) en la secuencia de OmpC tomando las siguientes consideraciones:

- El patrón se basa en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos. Quedando clasificados como cargados, hidrofóbicos y polares.

Clasificación de aminoácidos:

|                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| 1.- D E H K R G         | CARGADOS + GLICINA     |
| 2.- A V L I F M W T Y   | HIDROFOBICOS           |
| 3.- A V L I F M W T Y P | HIDROFOBICOS + PROLINA |
| 4.- D E H R K N Q S T G | POLAR + GLICINA        |

- Se busca un patrón de cuatro aminoácidos alineados donde el primero es cargado o glicina, los dos siguientes hidrofóbicos y el cuarto lugar corresponde a un aminoácido polar o cargado.

- Se busca un patrón de cinco aminoácidos donde el primero es cargado, los tres siguientes son hidrofóbicos y el quinto es cargado o polar.

### 5.1.2. Predicción de epitopos de B

Las predicciones de epitopos de B se realizaron con los

programas ANTIGEN (versión 2.15. 1989.) y FLEXPPO (versión 2.03. 1989) del paquete PCGENE, (PCGENE: the nucleic acid and protein sequence analysis software system. (C) A. Barroch/ University of Geneva /Switzerland; (T.M) Intelligenetics Inc. Release 6.26/ September 7, 1990). En una computadora OLIVETTI M290 con un sistema operativo MS DOS 5.0.

El programa ANTIGEN, basado en el método de Hoop y Woods, le asigna un valor de hidrofobicidad a cada aminoácido según la escala de Levitt derivada de Nozaki y Tanford (parámetros en solventes) (50). Realiza promedios de hidrofobicidad a lo largo de la secuencia por bloques sobrepuestos de seis aminoácidos (tamaño promedio de los sitios reportados como antigénicos reconocidos por anticuerpos). Muestra los resultados en un perfil de hidrofobicidad a lo largo de la secuencia y reporta los tres promedios mas altos del análisis. El segundo y tercer promedios más altos corresponden a un 43 y 50 % de correlación con la predicción de sitios antigénicos.

El programa FLEXPPO basado en el modelo de flexibilidad o movilidad de los antígenos reportado por Karpluz y Shulz toma como medida de flexibilidad los factores de temperatura atómica (valores B o factores Debye-Waller) del átomo de carbono alfa. B representa el mínimo desplazamiento de cada átomo en promedio bien determinado de posiciones (38). Normaliza los valores de B de cada átomo de carbono alfa por medio de la ecuación:

$$B \text{ (normalizada)} = (B + Dp) / (<B>p + Dp)$$

donde

$\langle B \rangle_p$  es el promedio de los valores de B de todos los átomos del carbono alfa de una proteína p sin contar los tres primeros aminoácidos del extremo amino terminal ni los tres últimos del extremo carboxilo terminal.

"Dp" es una constante de variación entre las proteínas con un valor de 0.3

"B" (normalizada) de una proteína es igual a 1.

El método clasifica a los aminoácidos según los valores de B en rígidos cuando presenten un valor de B menor que 1, por ejemplo A, L, H, V, Y, I, F, C, W y M, y en flexibles o móviles cuando B sea mayor de 1. Determina una segunda escala en función de los valores de B(normalizados) de los residuos vecinales contiguos (n+1, n-1). Cuando se presenta un vecino rígido el valor asignado es intermedio, ningún vecino rígido asigna un valor móvil, o dos vecinos rígidos corresponden a un valor de rigidez.

Esta segunda escala sirve para la predicción de flexibilidad de secuencias en una posición n, ponderando los valores desde las posiciones n - 3 a la n + 3 usando los valores: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 0.75, 0.5 y 0.25.

Reporta el perfil de movilidad como los valores de B a lo largo de la secuencia y los 10 valores de B más altos como posibles regiones antigénicas.

Se realiz<sup>ó</sup> el análisis con ventanas de 6 aminoácidos.

## 5.2. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS SEGMENTOS ANTIGENICOS PREDICHOS.

Para conocer la estructura secundaria que presentan las regiones antigénicas predichas, se analizó la secuencia completa de la porina Omp C de S. typhi 9,12 Vi:d mediante el programa NOVOTNY del paquete PCGENE. Este método propuesto por Novotny y Auffray en 1984 muestra los perfiles de álfa hélice, hojas beta plegadas, vueltas beta, hidrofobicidad y carga a lo largo de la secuencia analizada (59). Las propiedades de estructura secundaria están basadas en los parámetros de Chou-Fasman (60). El análisis de hidrofobicidad utiliza la escala de Rose y Roy. El perfil de carga lo reporta en función de la presencia de los siguientes aminoácidos: D, R, E, H, K. Se utilizó una ventana de 7 aminoácidos.

## 5.3. ANALISIS DEL ROMPIMIENTO CON BROMURO DE CIANOGENO

Para conocer la posible secuencia del péptido de 16 kD, derivado de la digestión con BRCN capaz de inducir proliferación celular *in vitro* de esplenocitos totales de ratones NIH inmunizados con PME de S. typhi (35), se utilizó el programa CUTPRO del paquete PCGENE para analizar la secuencia de la porina Omp C de S. typhi 9, 12 Vi:d. Este programa rompe la secuencia por un método de digestión determinado (en este caso BRCN) y presenta las siguientes características de los fragmentos resultantes:

- a) Posición en la secuencia original.

- b) El número de residuos que lo componen.
- c) El peso molecular.
- d) El punto isoeléctrico teórico.

#### 5.4 SINTESIS EN FASE SOLIDA

La síntesis se realizó sobre un soporte de polidimetilacrilamida Novasyn KA (Inglaterra).

La unión del primer aminoácido (0.25 mmoles) a la resina (0.5 g) se realizó mediante una reacción de esterificación, agregando 0.5 mmoles de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), como catalizador, en dimetilformamida (DMF) por dos horas con agitación frecuente. Al finalizar la reacción la resina se lavó con DMF, alcohol amílico, ácido acético y alcohol amílico dos veces. Y un último lavado con eter etílico. La resina se secó en alto vacío.

El grado de unión del primer residuo se determinó, de manera indirecta, cuantificando la desprotección de los grupos amino de 10 mg de resina tratadas con 3 ml de piperidina al 20% en DMF. El valor de absorbancia a 290 nm, debido a los grupos Fmoc libres, se interpoló en una curva patrón estimativa del porcentaje de unión (figura 9). Cuando el porcentaje de unión era menor del 70% se repetía la reacción de esterificación.

Para continuar con la síntesis, la resina se empacó en la columna de reacción del sintetizador con DMF y el primer paso fue la desprotección. El sintetizador consiste en un sistema de bombeo y válvulas, que permiten un flujo continuo de reactivos y

disolventes a través de la resina empacada en la columna de reacción.

Los ciclos de síntesis consistieron en:

|               |  |
|---------------|--|
| APLICACION    | 1) Carga del Fmoc-aminoácido activado con HOBT en el inyector.   |
| ACOPLAMIENTO  | 2) Recirculación por 2 horas.  |
| LAVADO        | 3) Lavado con DMF por 5 minutos.<br>4) Recirculación con el DMF por 1 minuto.<br>5) Aplicación de 2 ml de DMF en el inyector.<br>6) Recirculación con el DMF por 1 minuto.<br>7) Lavado con DMF por 5 minutos. |
| DESPROTECCION | 8) Flujo de piperidina al 20% en DMF por 10 minutos.   |

La figura 10 muestra el control o protocolo de síntesis.

El seguimiento de las reacciones de síntesis se realizó de dos formas:

1.- Vigilando la desprotección de los aminoácidos a 290 nm, por la liberación de los grupos Fmoc, con el tratamiento de piperidina al 20% en DMF por 10 minutos.

2.- Determinando grupos amino libres por la reacción de Kaiser para vigilar el acoplamiento. La aparición de coloración azul violeta, en un muestra de resina después del período de acoplamiento es indicativo de que no se formó el enlace peptídico.

Al finalizar la síntesis la resina se lavó y secó con el procedimiento antes mencionado en la unión del primer aminoácido. El desprendimiento del péptido de la resina se realizó con TFA al

95% por dos horas, éste fué eliminado por evaporación en alto vacío. El producto se lavó con éter etílico.

Un segundo tratamiento con TFA al 95% al producto permite obtenerlo más limpio.

El producto se disolvió en agua o ácido acético al 10% y se liofilizó.

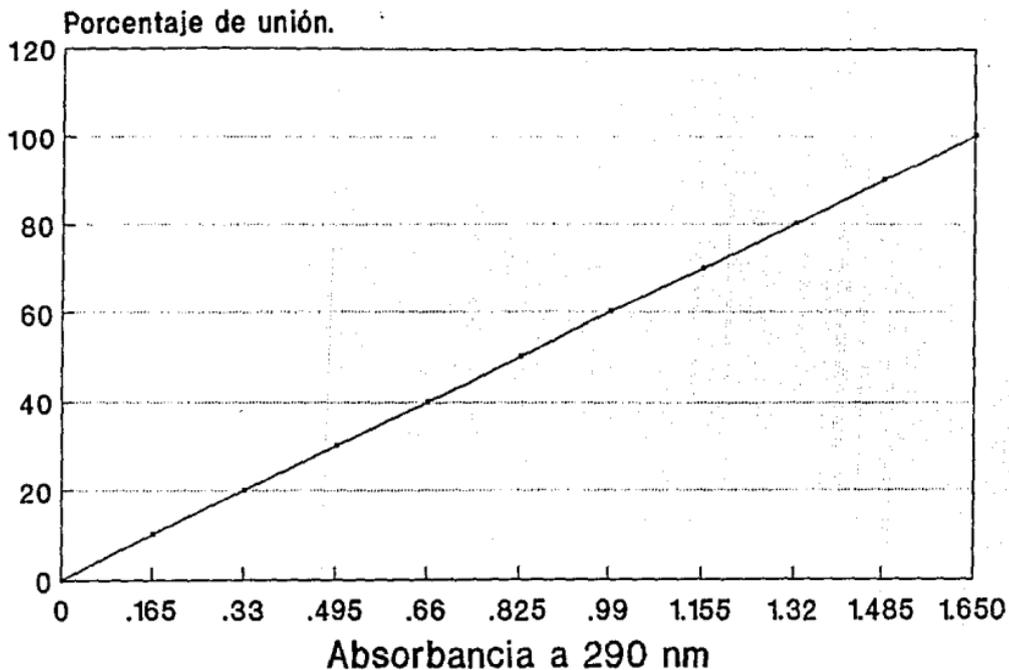


Figura 9. Estimación del porcentaje de unión del primer aminácido por los grupos Fmoc liberados en la desprotección. Tomado de "Practical notes Nova-Biochem".

|             |     | AMINOACIDO |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------|-----|------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| OPERACION   | min |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| LAVADO      |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| CARGA       |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| RECICLAJE   |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| LAVAR INYEC |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| RECICLAJE   |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| PRUEBA      |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| LAVADO      |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| CARGA DMF   |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| LAVADO      |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| PIPERIDINA  |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| LAVADO      |     |            |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Fecha\_\_\_\_\_ Operador\_\_\_\_\_

Resina\_\_\_\_\_ g.

Figura 10. Control de síntesis de péptidos.

Prueba: Reacción de Kaiser con 10 mg de resina.

## 5.5. PURIFICACION

La purificación de péptidos sintéticos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) bajo las siguientes condiciones (Ø1):

COLUMNA: C-18  $\mu$ -Bondapak 125 A. 10  $\mu$ m. 7.8 x 300 mm  
Waters.

FLUJO: 2.5 ml/min

SISTEMA DE GRADIENTE:

| Tiempo<br>(min) | Disolventes |    |
|-----------------|-------------|----|
|                 | %A          | %B |
| 0               | 100         | 0  |
| 20              | 60          | 40 |
| 25              | 60          | 40 |
| 30              | 100         | 0  |

Disolvente A: ácido trifluoroacético al 0.05% pH = 3.

Disolvente B: 10% del disolvente A en acetonitrilo.

LONGITUD DE ONDA DE LA DETECCION: 220 nm.

aufs (absorbance units to full scale): 0.2, 0.5, 2.0.

VELOCIDAD DE LA CARTA: 5mm/min.

## 5.6. ANALISIS DE AMINOACIDOS

### 5.6.1 Hidrólisis.

La hidrólisis de los péptidos se realizó con HCl 6N en

ampolletas selladas al vacío, calentando a 110 °C por 24 horas.

### 5.6.2. Derivados de o-ftaldehído

Después de eliminar el HCl por evaporación, los residuos se disolvieron en HCl 1N preparado en metanol. De este preparado se tomaron 100  $\mu$ l y se agregó 1 ml de fluorofenilalanina 500  $\mu$ M en metanol, como estándar interno.

La reacción con el orto-ftaldehído se realizó a pH 9 con amortiguador de boratos (solución saturada de ácido bórico).

El análisis de aminoácidos derivados de o-ftaldehído se realizó por cromatografía líquida de alta resolución, con un detector de fluorescencia (62), bajo las siguientes condiciones:

COLUMNA: C-18 Novapak analítica. Waters.

FLUJO: 1.5 ml/min.

SISTEMA DE GRADIENTE:

| Tiempo<br>(min) | Disolventes |    |
|-----------------|-------------|----|
|                 | %A          | %B |
| 0               | 83          | 17 |
| 35              | 45          | 55 |
| 50              | 16          | 84 |
| 55              | 83          | 17 |

DISOLVENTE A: Amortiguador de fosfatos pH 7.

DISOLVENTE B: 5% de disolvente A en acetonitrilo.

## 6. RESULTADOS

## 6.1 SEGMENTOS ANFIPATICOS.

Los segmentos anfipáticos de la porina Omp C de S. typhi 9,12 Vi:d predichos por el programa AMPHI se muestran en las tabla 1 y 2. Para la síntesis se eligieron las secuencias con mayor índice anfipático de los análisis realizados con ventanas de siete y once aminoácidos respectivamente. Las péptidos son:

|       |         |                      |                  |
|-------|---------|----------------------|------------------|
| Omp C | 27-46   | KDGNKLDLFGKVDGLHYFSD | (20 aminoácidos) |
| Omp C | 306-324 | LQSKGKDISNGYGASYGDQ  | (19 aminoácidos) |

6.2 BUSQUEDA DE PATRONES DE ROTHBARD EN LA SECUENCIA DE LA  
PORINA OmpC DE Salmonella typhi 9,12 Vi:d.

La nomenclatura utilizada para la búsqueda de patrones de Rothbard fué:

| PROPIEDAD   | CLAVE |
|-------------|-------|
| Cargado     | c     |
| Hidrofóbico | h     |
| Polar       | p     |
| Glicina     | g     |
| Prolina     | pro   |

| PATRON | POSICION |    |    |     |    |
|--------|----------|----|----|-----|----|
|        | 1º       | 2º | 3º | 4º  | 5º |
| I      | c        | h  | h  | p   |    |
|        | c        | h  | h  | g   |    |
|        | g        | h  | h  | p   |    |
|        | g        | h  | h  | g   |    |
| II     | c        | h  | h  | h   | p  |
|        | c        | h  | h  | h   | g  |
|        | c        | h  | h  | pro | p  |
|        | c        | h  | h  | pro | g  |
|        | g        | h  | h  | h   | p  |
|        | g        | h  | h  | h   | g  |
|        | g        | h  | h  | pro | p  |
|        | g        | h  | h  | pro | g  |

Los patrones de Rothbard de la porina Omp C de S. typhi 9,12 Vi:d se muestran en la tabla 3.

Dentro de los epitopos de T elegidos se encontraron los patrones reportados por Rothbard (Figura 13):

|       |         |                     |       |      |
|-------|---------|---------------------|-------|------|
| Omp C | 27-46   | KGNKLDLFGKVDGLHYFSD | 33-36 | DLFG |
| Omp C | 306-307 | LQSKGKDISNGYGASYGDO | 42-45 | HYFS |

### 6.3 SEGMENTOS HIDROFILICOS.

Los segmentos hidrofílicos de la porina Omp C de S. typhi se muestran en la tabla 4 y el perfil de hidrofílicidad en la figura 11.

### 6.4. SEGMENTOS FLEXIBLES.

Los segmentos flexibles de la porina Omp C de S. typhi se muestran en la tabla 5 y el perfil de flexibilidad en la figura 12.

Los péptidos 47-53, 307-313 y 26-31 obtuvieron la mayor puntuación en el análisis de hidrofílicidad del programa ANTIGEN, y en vista de que no hubo grandes diferencias en cuanto a las puntuaciones de los 10 péptidos más flexibles, se decidió sintetizar los siguientes péptidos (figura 13):

|       |         |          |                 |
|-------|---------|----------|-----------------|
| Omp C | 46-53   | DDKGSDDG | (8 aminoácidos) |
| Omp C | 307-313 | QSKGKDI  | (7 aminoácidos) |

Tabla 1. SEGMENTOS ANFIPATICOS DE LA PORINA Omp C DE Salmonella typhi 9,12 Vi:d PREDICHOS POR EL PROGRAM AMPHI

| COMPUTO REALIZADO CON VENTANA DE ONCE AMINOACIDOS |          |           |      |          |
|---|----------|-----------|------|----------|
| No. BLOQUE  | BLOQUE * | SECUENCIA |      | I. A. ** |
| 1   | 122-133  | 117-138   | 30.5 | P        |
| 2   | 32-41    | 27-46     | 22.3 | K, K, K  |
| 3   | 311-319  | 306-324   | 19.4 | K +      |
| 4   | 324-331  | 319-336   | 18.8 | K +      |
| 5   | 69-75    | 64-80     | 15.6 |          |
| 6   | 102-108  | 99-111    | 15.3 | K +      |
| 7   | 150-157  | 145-162   | 14.4 |          |
| 8   | 257-262  | 252-267   | 13.4 |          |
| 9   | 159-163  | 154-168   | 11.7 |          |
| 10  | 286-291  | 281-297   | 11.5 | K +      |
| 11  | 89-92    | 84-97     | 8.5  |          |
| 12  | 200-203  | 195-208   | 8.2  |          |
| 13  | 110-113  | 105-118   | 7.7  |          |
| 14  | 20-22    | 15-27     | 6.1  | K        |
| 15  | 366-369  | 361-374   | 5.9  |          |
| 16  | 342-343  | 337-348   | 5.1  | K +      |
| 17  | 26-28    | 21-23     | 4.9  | K, K     |
| 18  | 268-270  | 263-275   | 4.5  | P        |
| 19  | 223-224  | 218-229   | 4.4  |          |
| 20  | 353-355  | 348-360   | 4.3  | K, K+    |
| 21  | 333-335  | 328-340   | 4.1  | K, K     |

Tabla 2 SEGMENTOS ANFIPATICOS DE LA PORINA Omp C DE  
Salmonella typhi 9,12 Vi:d PREDICHOS POR EL PROGRAMA AMPHI.

COMPUTO REALIZADO CON VENTANA DE SIETE AMINOACIDOS.

| No. BLOQUE | BLOQUE * | SECUENCIA | IA** |        |
|------------|----------|-----------|------|--------|
| 1          | 123-131  | 119-134   | 22.7 | P      |
| 2          | 256-262  | 253-265   | 16.0 |        |
| 3          | 310-316  | 307-319   | 15.1 | K, K + |
| 4          | 86-90    | 83-93     | 11.2 |        |
| 5          | 35-39    | 32-42     | 11.1 | K +    |
| 6          | 71-74    | 68-77     | 9.2  |        |
| 7          | 327-329  | 324-332   | 9.0  | K +    |

\* PUNTOS MEDIOS DEL BLOQUE

\*\* INDICE ANFIPATICO

+ LISINAS O PROLINAS DENTRO DE LA SECUENCIA, REPORTADAS POR EL PROGRAMA.

Tabla 3. PATRONES DE ROTHBARD DE LA PORINA Omp C DE

Salmonella typhi 9,12, Vi:d.

| RESIDUOS | SECUENCIA | PATRON |    |
|----------|-----------|--------|----|
| 17-20    | GAAN      | ghhp   | I  |
| 23-26    | GIYN      | chhp   | I  |
| 33-36    | DLFG      | chhg   | I  |
| 102-105  | LFAD      | chhp   | I  |
| 116-120  | GVTYD     | chhhp  | II |
| 120-123  | DVTS      | chhp   | I  |
| 126-129  | DTYG      | chhg   | I  |
| 134-137  | DTYG      | chhg   | I  |
| 156-159  | DFFG      | chhg   | I  |
| 159-162  | DFFG      | chhg   | I  |
| 165-169  | GVVD      | ghhp   | I  |
| 279-282  | GFAN      | ghhp   | I  |
| 288-292  | EVVAQ     | chhhp  | II |
| 325-328  | DIVK      | chhp   | I  |
| 328-331  | KYVD      | chhp   | I  |
| 357-360  | DFTR      | chhp   | I  |
| 372-376  | GLVYQ     | ghhhp  | II |

**Tabla 4. SEGMENTOS HIDROFILICOS DE LA PORINA Omp C DE Salmonella typhi 9,12 Vi:d PREDICHOS POR EL PROGRAMA ANTIGEN**

| PEPTIDO | SECUENCIA | PUNTUACION HIDROFILICA |
|---------|-----------|------------------------|
| 45-51   | DDKGS D   | 2.05                   |
| 307-312 | QSKGLD    | 1.58                   |
| 26-31   | NKDG NK   | 1.57                   |

**Tabla 5. SEGMENTOS FLEXIBLES DE LA PORINA Omp C DE Salmonella typhi 9,12 Vi:d PREDICHOS POR EL PROGRAMA FLEXP**

| PEPTIDO | SECUENCIA | VALORES DE B(NORMALIZADA) |
|---------|-----------|---------------------------|
| 268-275 | TSNGSNPS  | 1.133                     |
| 85-91   | QTEGSND   | 1.121                     |
| 47-53   | DKGSDGD   | 1.109                     |
| 219-225 | TADQNTT   | 1.106                     |
| 178-184 | SGEQTQG   | 1.105                     |
| 307-313 | QSKGKDI   | 1.105                     |
| 171-177 | QGKNGSV   | 1.098                     |
| 188-194 | LNQNGDG   | 1.092                     |
| 143-149 | QQRNGY    | 1.088                     |
| 26-32   | NKDG NK L | 1.084                     |

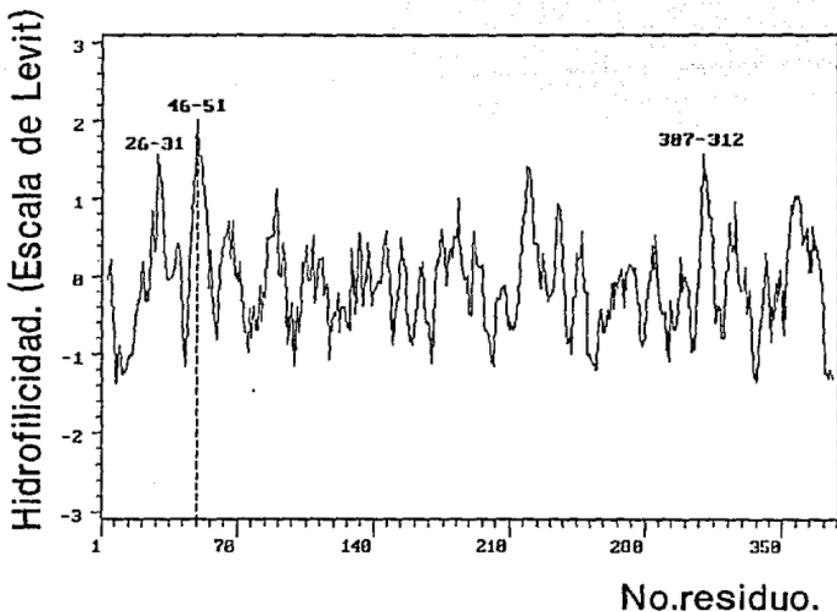


Figura 11. Perfil de hidrofiliidad de la secuencia Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d. Cómputo realizado con una ventana de seis aminácidos. Programa de Hoop y Woods (ANTIGEN-PCGENE). Las regiones con mayor puntuación hidrofílica fueron: 46-53, DDKGSDGD; 307-312, QSKGLD y 26-31, NKDGNK.

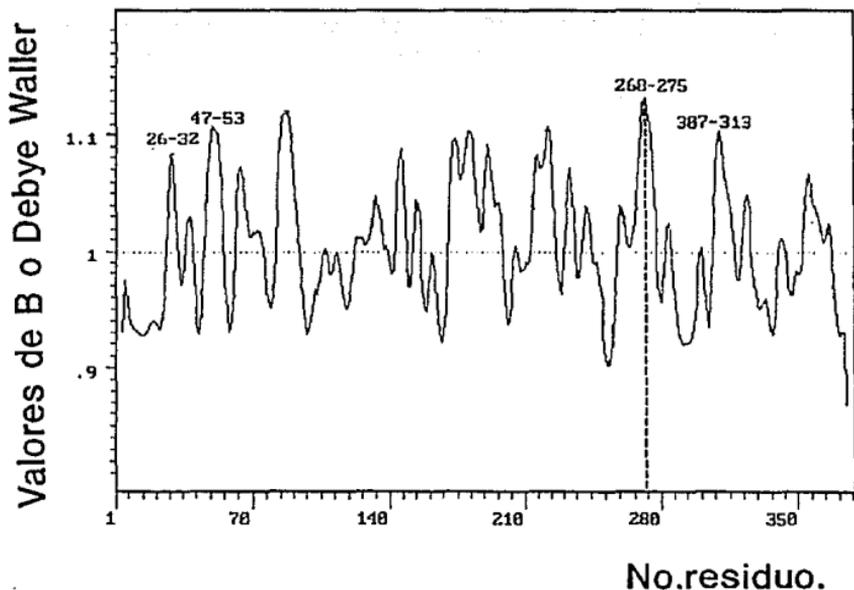


Figura 12. Perfil de flexibilidad de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12 Vi:d. Cómputo realizado con una ventana de seis aminoácidos. Programa de Karpluz y Shulz (FLEXPRO-PCGENE). Los segmentos de mayor puntuación hidrofílica y valor de B fueron: 26-32, NKDGNKL; 47-53, DKGSDGD; 268-275 TSNGSNPS, 307-313, QSKGKDI.

|    |   |   |
|----|---|---|
| 26 | N |   |
| 27 | K |   |
| 28 | D |   |
| 29 | G |   |
| 30 | N |   |
| 31 | K |   |
| 32 | L |   |
| 33 | D |   |
| 34 | L | R |
| 35 | F |   |
| 36 | G |   |
| 37 | K |   |
| 38 | V |   |
| 39 | D |   |
| 40 | G |   |
| 41 | L |   |
| 42 | H |   |
| 43 | Y | R |
| 44 | F |   |
| 45 | S |   |
| 46 | D |   |
| 47 | D |   |
| 48 | K |   |
| 49 | G | B |
| 50 | S |   |
| 51 | D |   |
| 52 | G |   |
| 53 | D |   |

T

|     |   |   |
|-----|---|---|
| 306 | L |   |
| 307 | Q |   |
| 308 | S |   |
| 309 | K | B |
| 310 | G |   |
| 311 | K |   |
| 312 | D |   |
| 313 | E |   |
| 314 | S |   |
| 315 | N |   |
| 316 | G |   |
| 317 | Y |   |
| 318 | G |   |
| 319 | A |   |
| 320 | S |   |
| 321 | Y |   |
| 322 | G |   |
| 323 | D |   |
| 324 | Q |   |

T

Figura 13. Esquema de los péptidos elegidos.

Abreviaturas: T, epitopos de T; B, epitopos de B; R, patrones de Rothbard.

### 6.5. SINTESIS EN FASE SOLIDA

Se sintetizó el péptido 46-53 DDKGSDGD con un rendimiento del 10%.

El porcentaje de unión a la resina del primer aminoácido (ácido aspártico) fué del 70 %, y con ésta se empacó la columna de reacción del sintetizador.

A continuación se muestran los resultados del monitoreo de la desprotección (liberación del grupo Fmoc):

**Tabla 6. LECTURAS DE ABSORBANCIA DE FRACCIONES RECOLECTADAS DURANTE LA DESPROTECCION.**

| FRACCION* | A M I N O A C I D O S |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|           | asp                   | gli  | asp  | ser  | gli  | lis  | asp  | asp  |
| 1         | 2.44                  | 2.03 | -    | 2.69 | 0.56 | 2.92 | 2.60 | 2.33 |
| 2         | 2.43                  | 2.37 | 2.27 | 2.69 | 2.70 | 2.62 | 2.60 | 2.50 |
| 3         | 0.10                  | 0.50 | 2.09 | 2.70 | 1.17 | 1.85 | 2.08 | 0.43 |
| 4         | -                     | -    | -    | 0.81 | 0.09 | 0.03 | -    | -    |
| 5         | -                     | -    | -    | -    | 0.04 | -    | -    | -    |
| 6         | -                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |

LONGITUD DE ONDA: 290.

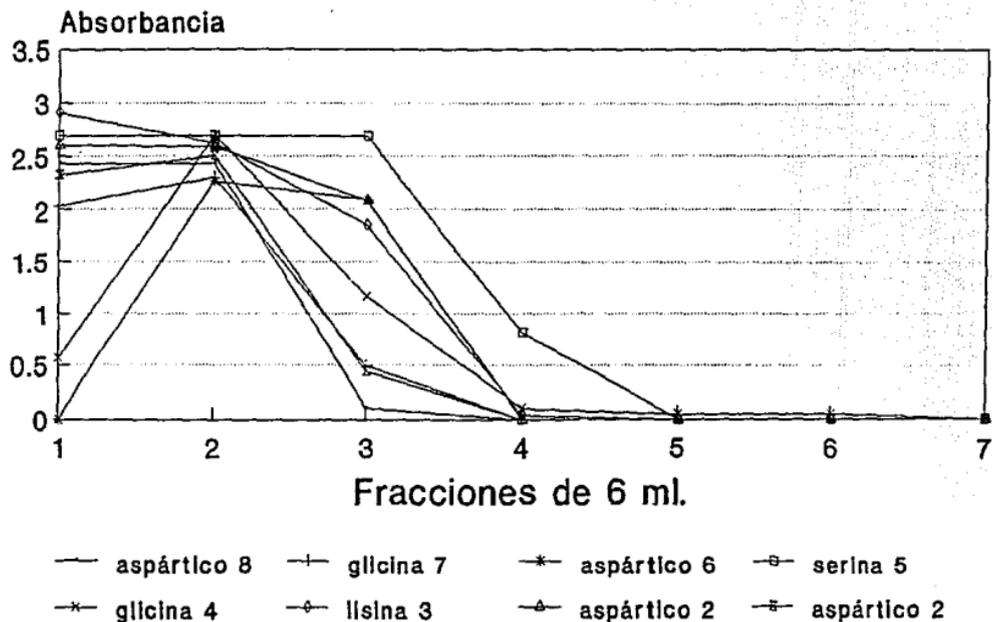
DIAMETRO DE LA CELDA: 1 cm.

ESPECTROFOTOMETRO Beckman Du-7

BLANCO: piperidina al 20% en DMF.

\* Fracciones de 6 ml colectadas cada dos minutos.

(Figura 14)



Longitud de onda 290 nm

Figura 14. Seguimiento de la desprotección. Liberación de grupos Fmoc durante la síntesis del péptido 46-53 DDRGSDGD.

#### 6.5.1. Características físicas del producto crudo

El producto tiene una apariencia grumosa de color blanco-amarillenta, opaco y al manipularlo se adhiere a las superficies del material de vidrio y acero.

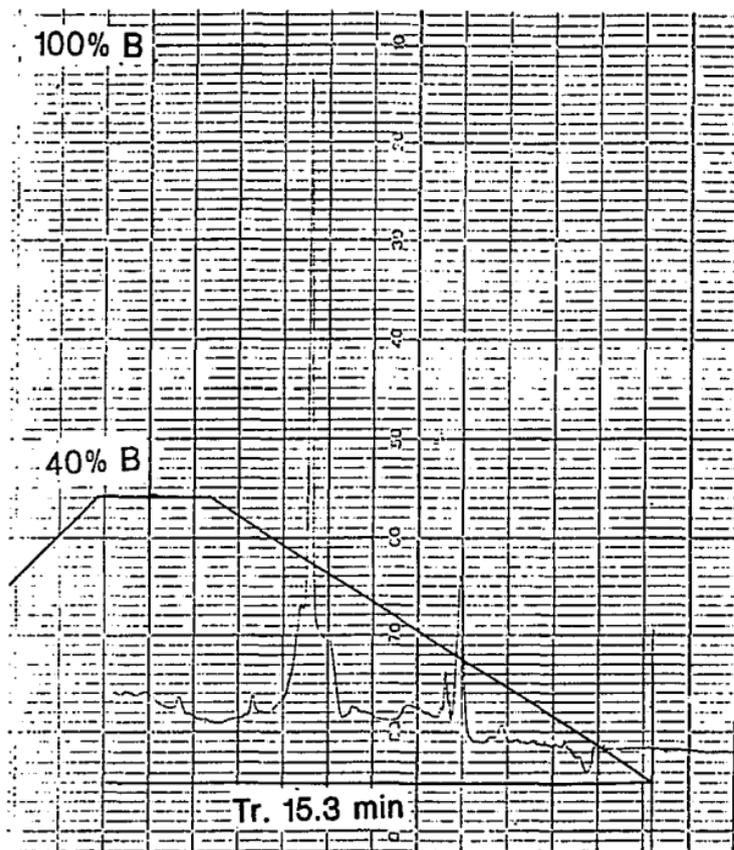
#### 6.6. PURIFICACION

El cromatograma de purificación del péptido 46-53 (Figura 15) muestra un producto principal que sale de la columna preparativa en un tiempo de retención de 15.3 minutos.

#### 6.7. ANALISIS DE AMINOACIDOS

El cromatograma de derivatización, del hidrolizado del producto crudo de la síntesis, muestra significativamente la composición de los aminoácidos del péptido (Figura 16).

Los tiempos de retención de estándares de aminoácidos (tabla 7) corresponden a los aminoácidos presentes en la secuencia sintetizada, así como el tamaño de la señal (tabla 8).



| T  | %A  | %B |
|----|-----|----|
| 0  | 100 | 0  |
| 20 | 60  | 40 |
| 25 | 60  | 40 |
| 30 | 100 | 0  |

A: TFA 0.05 % pH 3  
 B: 90% Acetonitrilo  
 10% A.

Longitud de onda: 220 nm.

Flujo 2.5 ml

Columna C-18  $\mu$ Bondapack  
 semipreparativa.

Velocidad de la carta: 5mm/min.

AUFS: 0.5

Figura 15. Cromatograma de purificación del péptido 46-53

DDKGS DGD.

**Tabla 7. TIEMPOS DE RETENCION DE LOS DERIVADOS DEL ORTO-FALDEHIDO  
DE AMINOACIDOS ESTANDARES \***

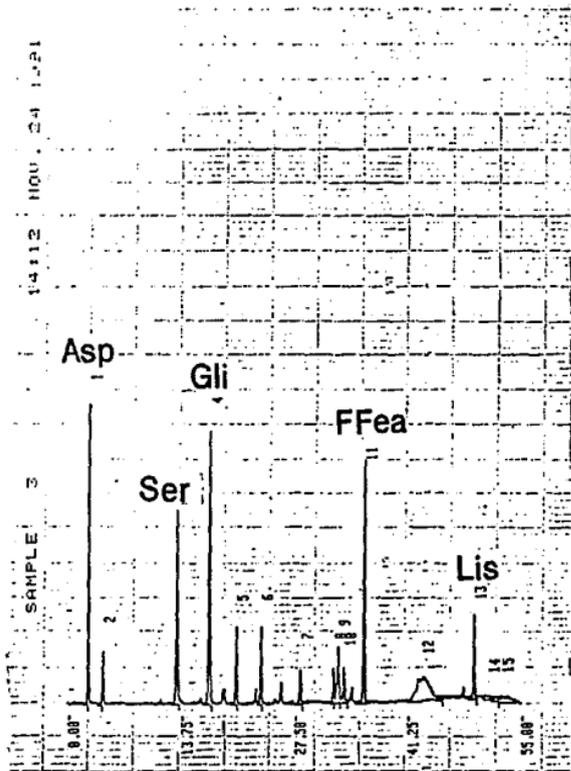
| AMINOACIDO           | TIEMPO DE RETENCION<br>(min) |
|----------------------|------------------------------|
| serina               | 13.7                         |
| glicina              | 17.6                         |
| lisina               | 49.7                         |
| ac.aspártico         | 3.0                          |
| fluorofenilalanina** | 36.3                         |

\*Datos experimentales del Laboratorio de Genética de la  
Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

\*\* estándar interno de cada inyección.

**Tabla 8. TIEMPOS DE RETENCION DE LOS PICOS PRINCIPALES DEL  
CROMATOGRAMA DEL ANALISIS DE AMINOACIDOS**

| PICO | TIEMPO DE RETENCION<br>(min) | AMINOACIDO CORRESPONDIENTE |
|------|------------------------------|----------------------------|
| 1    | 2.485                        | ácido aspártico            |
| 3    | 13.211                       | serina                     |
| 4    | 17.135                       | glicina                    |
| 11   | 35.915                       | fluorofenilalanina         |
| 13   | 49.355                       | lisina                     |



| No. pico | Tiempo de retención (min) | Area   | Concentración (%) |
|----------|---------------------------|--------|-------------------|
| 1        | 22.485                    | 49571  | M 11.6085         |
| 2        | 14.305                    | 11941  | M 2.7965          |
| 3        | 13.211                    | 49564  | M 11.6069         |
| 4        | 17.135                    | 73197  | M 17.1413         |
| 5        | 20.368                    | 18441  | M 4.3184          |
| 6        | 23.421                    | 19242  | M 4.2720          |
| 7        | 28.228                    | 9273   | M 2.1717          |
| 8        | 32.241                    | 8416   | M 1.9709          |
| 9        | 32.808                    | 19508  | M 4.5635          |
| 10       | 33.521                    | 10867  | M 2.5448          |
| 11       | 35.915                    | 57686  | M 13.5039         |
| 12       | 43.088                    | 62542  | M 14.6460         |
| 13       | 49.355                    | 17791  | M 4.1662          |
| 14       | 51.035                    | 8975   | M 2.1018          |
| 15       | 52.695                    | 11004  | M 2.5769          |
| TOTAL    |                           | 427023 | 100.0000          |

Figura 16. Análisis de aminoácidos del péptido DDKGBDGD, utilizando como derivatisante el orto-ftaldehído.

## 7. DISCUSION DE RESULTADOS.

Las predicciones de epitopos reconocidos por linfocitos B realizada por dos programas, diferentes en cuanto a la búsqueda de propiedades antigénicas, coinciden en las posibles secuencias antigénicas. Lo que nos indica que existen regiones de la porina Omp C expuestas al medio externo que les permite ser reconocidas por anticuerpos. Para conocer qué tipo de estructura secundaria presentan estas regiones, se decidió realizar un análisis de la secuencia completa utilizando el programa NOVOTNY (59) de PCGENE. Donde los perfiles de hidrofobicidad, hojas beta plegadas, alfa hélices, vueltas beta y carga; nos proporcionaron otra evidencia para apoyar esta hipótesis de regiones expuestas. El segmento 25-50 presenta alta propensión a las vueltas con una distribución de cargas regular así como de hidrofobicidad. El segmento 300-330 al igual que el anterior presenta alta propensión a las vueltas pero con hidrofobicidad marcada (baja hidrofobicidad). (Figura 17)

La estructura de las porinas Omp F y Pho E de Escherichia coli consiste en barriles hidrofílicos de estructuras beta antiparalelas, inmersas en la membrana, estabilizadas por uniones proteína-proteína (11,12). De manera que los segmentos predichos pueden corresponder a las vueltas beta de la proteína expuestas al medio externo debido al plegamiento de los barriles beta.

Las predicciones muestran que los epitopos reconocidos por los linfocitos T de la porina Omp C de Salmonella typhi contienen



secuencias reconocidas por linfocitos B, además de contener patrones de Rothbard. El epitopo de T 306-324 contiene al epitopo de B 307-313 y el 27-46 contiene al 26-32 (tercer lugar en ANTIGEN y FLEXPRO). Por otra parte la presencia de patrones de Rothbard apoya la estructura anfipática característica de un sitio reconocible por linfocitos T.

El péptido de 16 kD, producido por la fragmentación con bromuro de cianógeno, capaz de estimular esplenocitos totales de ratones NIH inmunizados con porinas de *S. typhi* 9,12 Vi:d (35,36), posiblemente contenga las secuencias predichas en este trabajo. El bromuro de cianógeno rompe a las proteínas en los residuos de metionina. De acuerdo al programa CUTPRO el tratamiento con bromuro de cianógeno produce cuatro segmentos que presentarían las siguientes características:

|   | FRAGMENTO | No.DE RESIDUOS | PM (kD) |
|---|-----------|----------------|---------|
| 1 | 22-57     | 36             | 4,057.  |
| 2 | 58-142    | 85             | 9,627.  |
| 3 | 143-342   | 200            | 21,574. |
| 4 | 343-377   | 35             | 4,040.  |

La digestión incompleta de la proteína produciría los siguientes fragmentos:

|           | FRAGMENTO | No.DE RESIDUOS | PM (kD) |
|-----------|-----------|----------------|---------|
| 1 + 2     | 22-142    | 121            | 13,684  |
| 1 + 2 + 3 | 22-342    | 321            | 34,263  |
| 2 + 3     | 58-342    | 285            | 30,206  |
| 3 + 4     | 143-377   | 235            | 25,619  |
| 2 + 3 + 4 | 58-377    | 320            | 36,246  |

En la siguiente tabla se muestran los péptidos reportados por

Patlán (35) y La correlación con los mencionados arriba:

| FRAGMENTO | PESO MOLECULAR (kD) | FRAGMENTO CORRESPONDIENTE. |
|-----------|---------------------|----------------------------|
| 1         | 28,985.             | 3 + 4 (25,619 kD)          |
| 2         | 19.040.             | 3 (21,574 kD)              |
| 3         | 15,971              | 1 + 2 (13,684 kD)          |
| 4         | 9.092.              | 2 (9,627 kD)               |

De aquí que el péptido de 16 kD pueda corresponder a la secuencia 22-142 que contiene a la secuencia 27-46 predicha como epitopo de T.

En cuanto a la síntesis del péptido DDKGSDGD, el porcentaje de unión del primer aminoácido fué aceptable, sin embargo un mayor porcentaje de unión favorecerá el aumento del rendimiento final.

El monitoreo de las reacciones de síntesis nos muestra que realmente hubo una liberación de los grupos Fmoc de los aminoácidos. La absorbancia a 290 nm, de las fracciones colectadas, disminuyó hasta valores de cero indicándonos la eliminación de estos grupos.

La apariencia del producto nos indica que existen contaminantes involucrados en el proceso de síntesis que evitan la obtención de un producto cristalino. Los posibles contaminates pueden ser los grupos protectores de las cadena laterales de los aminoácidos como son el grupo terbutilo del carboxilo beta del aspártico o el grupo 2-(4-bifenil)-2 propiloxicarbonilo) del delta amino de la lisina. Estos liberados en el momento del desprendimiento con TFA al 95%.

Se observó además la necesidad de utilizar ácido TFA recién

destilado ya que las impurezas introducidas por éste provocan la formación de un producto caramelizado de color pardo, poco soluble en agua o ácido acético al 10%.

En la síntesis en fase sólida existen como contaminantes comunes una serie de péptidos que podríamos clasificar como sigue:

- 1.- Péptidos modificados con uno o más residuos alterados.
- 2.- Péptidos sobreadicionados con uno o más residuos.
- 3.- Péptidos cortos intermedios con la pérdida de uno o más residuos.
- 4.- Péptidos cortos terminales con uno o varios residuos terminales faltantes.

De manera que si la síntesis es eficiente el producto principal debe ser el péptido de secuencia completa. En el cromatograma de purificación la aparición de un pico mayor indica un producto predominante. Además nos indica que otros contaminantes como los grupos protectores no interfieren en el proceso de purificación. El péptido sale de la columna durante el gradiente, lo cual justifica su naturaleza hidrofílica rica en aspárticos.

El análisis de aminoácidos nos muestra la composición del péptido de manera cualitativa. Aunque no podamos precisar la secuencia del producto sí podemos decir que el péptido sintetizado corresponde a la secuencia 46-53 DDKGSDGD, por la forma en la que se dirige la síntesis y el tamaño de las señales del cromatograma. Este nos muestra una señal mayor para el ácido aspártico y la glicina que son los aminoácidos predominantes de la secuencia.

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Después de analizar la secuencia de la porina Omp C de Salmonella typhi 9,12, Vi:d mediante algoritmos de predicción de epitopos, los posibles péptidos antigénicos son:

### Reconocibles por linfocitos B:

|         |           |
|---------|-----------|
| 46-53   | DDKGS DGD |
| 307-313 | QSKGKDI   |

### Reconocibles por linfocitos T:

|         |                      |
|---------|----------------------|
| 27-46   | KDGNKLDLFGKVDGLHYFSD |
| 306-324 | LQSKGKDISNGYGASYGDQ  |

El péptido 27-46 posiblemente forme parte del péptido de 16 kD capaz de estimular esplenocitos totales de ratón NIH inmunizados con PME de Salmonella typhi, reportado previamente (35,36).

Por el análisis de estructura secundaria de los epitopos elegidos, es probable que se traten de regiones de la porina Omp C que presentan vueltas beta expuestas al medio hidrofílico.

Los resultados preliminares de síntesis muestran que el rendimiento fué bajo, por lo que se requiere optimizar el monitoreo del acoplamiento para mejorar las condiciones de reacción.

Optimizar el proceso de síntesis nos permitirá en un futuro conjugar los péptidos a proteínas acarreadoras para realizar ensayos en animales, producir polímeros de epitopos de B y T,

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

realizar sustituciones de aminoácidos con aminoácidos modificados, que nos permita identificar los aminoácidos del péptido antigénico involucrados en la interacción con el anticuerpo o con los receptores.

Por otra parte, la posibilidad de producir péptidos modificados de inmunogenicidad mayor que la de los péptidos nativos nos permitiría, en un momento dado conjugarlos con las mismas porinas o con otras proteínas antigénicas como el toxoide tetánico o la subunidad B de la toxina del cólera.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kumate, J. 1980. Fiebre Tifoidea. En: Kumate, J. y Gutierrez G. (Eds) Manual de Infectología. Séptima edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. 45-55.
- 2.- Anuario estadístico 1987. Dirección General de Información y Estadística. Subsecretaría de Planeación, S.S. 1988.
- 3.- Di Rienzo, J.M., Nakamura, K. e Inouye, M. 1987. The outer membrane proteins of gram negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. Annu. Rev. Biochem. 47:481-532.
- 4.- Osborn, M.J. y Wu, H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 34:369-422.
- 5.- Nikaido, H. y Vaara, M. 1985. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49:1-32.
- 6.- Datta, D.B., Arden, B. y Henning, U. 1977. Major protein of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. J. Bacteriol. 128:821-829.
- 7.- Schweizer, M. y Henning, U. 1977. Action of major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 108:553-563.
- 8.- Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from outer membrane of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta. 415:335-377.
- 9.- Hancock, R.E.W. 1987. Role of porins in outer membrane permeability. J. Bacteriol. 169:929-933.
- 10.- Nikaido, H. y Vaara, M. 1987. Outer Membrane. En:

Neidhardt, F.C. (Ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 7-22.

11.- Rosenbusch, J.P. 1987. Three Dimensional Structure of Membrane Proteins. En: Masayori Inouye (Eds). Bacterial outer membranes as model systems. John Wiley and Sons. USA. 141-162.

12.- Jap, B.K. 1989. Molecular design of Pho E porin and its functional consequences. *J. Mol. Biol* 205:407-419.

13.- Brass, M.J. 1986. The cell envelope of Gram-negative bacteria: new aspects of its functions in transport and chemotaxis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 129:1-16.

14.- Lugtemberg, B. y Van Alphen, L. 1983. Molecular Architecture and functioning of the outer membrane of *E. coli* and other Gram negative bacteria. *Biochem Biophysic Act.* 737: 51-115.

15.- Frasc, C.E. y Robbins, J.D. 1978. Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. *J. Exp. Med.* 147: 629-644.

16.- Buchanan, T.M., Pearce, W.A., Scholnick, G.K. y Arko, R.J. 1977. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. *J. Infect. Dis.* 136(supl): 132-137.

17.- Buchanan, T.M. y Arko, R.J. 1977. Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 135:879-887.

18.- Kussi, N., Nurmien, M., Saxen, H., Valtonen, M. y Mäkelä,

P.H. 1982. Immunization with outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice. *Infect. Immun.* 25: 857-862.

19.- Kussi, N., Nurmien, M., Saxen, H. y Mäkelä, P.H. 1982. Immunization with outer membrane protein (porin). Preparations in experimental murine salmonellosis: Effect of Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34:328-332.

20.- Guling, P.A., McCracken, G.H., Frich, C.F., Johnston, K.H. y Hansen, E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic haemophilus disease. *Infect. Immun.* 37:82-88.

21.- Adamus, G., Mulczka, M., Witkowska, D. y Romanowska, E. 1980. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. *Infect. Immun.* 30:321-324.

22.- Guilleland, H.E., Parker, M.G., Matthew, J.W. y Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* 44:49-54.

23.- Blake, M.S. y Gotschilin, E.C. 1983. Gonococcal membrane proteins: speculation on their role in pathogenesis. *Prog. Allergy* 33:298-313.

24.- Mandrell, R.E. y Zollinger, W.D. 1989. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection of vaccination. *Infect. Immun.* 57:1590-1598.

25.- Caldwell, H.D. y Perry, L.J. 1982. Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major

outer membrane proteins. Infect. Immun. 38:745-754.

26.- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. y Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Infect. Immun. 56:2953-2959.

27.- Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., Muy, M., González, C.R., García, J.A. y Kumate, J. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. Vaccine. Enviado a publicación.

28.- Ortiz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E. y Kumate, J. 1989. Immunoblot detection of class-specific humoral immuneresponse to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27:1640-1645.

29.- Paniagua-Solis, J.F. 1990. Aislamiento y caracterización de porinas de *Salmonella typhi* capaces de inducir inmunidad protectora en un modelo murino. Tesis. Maestría en Ciencias Biomédicas -Inmunología-. Facultad de Medicina, U.N.A.M. México, D.F. Mexico.

30.- Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C., y Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever: Monoclonal antibodies against *S.typhi* porins. En: Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. y Jaz, J. (Eds.) Cell function and disease. Plenum Press, New York, N.Y. 281-292.

31.- Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M.,

González,C., García,J.A., Islas,S. y Kumate,J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. Ensayo de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. Arch. Invest. Med. (Mex.). 20:315-320.

32.- González,C., Isibasi,A., Ortiz,V., Blanco,F., Moreno,J. y Kumate, J. 1989. Cell-mediated immune response to porins from *Salmonella typhi* in mice. 7th International Congress of Immunology, Berlin, RFA. p664.

33.-Martínez,G., González,C.R., Pelayo,R., Paniagua,J., Muy,M., Isibasi,A. y Kumate,J. 1989. Identificación de péptidos de porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d capaces de estimular respuesta inmune celular en un modelo murino. VIII Congreso Nacional de Inmunología, SLP, México.

34.-Blanco,F., Isibasi,A., González,C.R., Ortiz,V., Paniagua,J., Arreguín,C. y Kumate,J. 1989. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. Manuscrito en preparación.

35.-Patlán,O.A. 1990. Obtención, separación, purificación y determinación de la capacidad inmunogénica de los péptidos de porinas de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d, obtenidos por digestión con bromuro de cianógeno. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán, UNAM. México.

36.- González,C.R., Isibasi,A., Ortiz,V., Paniagua,J., García,J.A. y Kumate,J. 1992. Cell mediated immune response to outer membrane proteins isolated from enterobacterias. J. Infect. Dis. Enviado a publicación.

- 37.-Richards,F.F., Rosenstein,R.W., Varga,J.M. y Konigsberg, W.H. 1978. En Immunoglobulins, Litman,G.W., y Good, R.A. (Eds.). Plenum Press. 117-154.
- 38.- Van Regenmortel, M.H.V. 1986. Wich structural features determine protein antigenicity?. TIBS 11:36-39.
- 39.- Benjamin,D.C., Berzofsky,J.A., East,I.J., Gord,F.R.N., Hannum,C., Leach,S.J., Margoliash,E., Michael,J.G., Miller,A., Prager,E.M., Reichlin,M., Sercaz,E.E., Smith-Gill,S., Todd,P.E. y Wilson,A.C. 1984. The antigenic structure of proteins: A reappraisal. Ann. Rev. Immunol. 2:67-101.
- 40.- Laver,G.W., Air,G.M., Webster,R.G. y Smith-Gill,S.J. 1990. Epitopes on proten antigens: misconceptions and realities. Cell 61:553-556.
- 41.- Stanfield,R.L., Fieser,T.M., Lerner,R.A. y Wilson, I.A. 1990. Crystal structures of an antibody to peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 A. Science 248:712-719.
- 42.- Milich,D.R. 1989. Synthetic T and B cell recognition sites:Implications for vaccine development. Adv.Immunol. 45:195-282.
- 43.- Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. Ann. Rev. Immunol. 2:395-428.
- 44.- Jahning,F. 1990. Structure predictions of membrane proteins are not that bad. TIBS 15:93-95.
- 45.- Fasman,G.D. 1989. Protein Conformational prediction. TIBS 14 295-299.
- 46.-Margalit,H., DeLisi,C., Berzofsky,J.A. 1990. Computer

Prediction of T-Cell Epitopes. En: Woodrow,G.C., Levine,M.M. (Eds.)  
NEW GENERATION VACCINES. Marcel Dekker Inc. NY. 109-116.

47.-Margalit,H., Spouge,J.L, Cornette,J.L, Cease K.B., De  
Lisi,C. y Berzofsky,J.A. 1987. Prediction of immunodominant helper  
T cell antigenic sites from the primary sequence. J. Immunol  
138:2213-2229.

48.- Rothbard,J.B. y Taylor,W.R. 1988. A sequence pattern  
common to T cell epitopes. EMBO J. 7:93-100.

49.- Roitt,I., Brostoff,J., Male,D. 1989. Immunology. Second  
edition. Gower Medical Publishing. London-NY.p 7.9.

50.- Hoop, T.P. y Woods, K.R. 1981. Prediction of protein  
antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad.  
Sci. U.S.A. 78:3824.

51.- Van Regenmortel,M.H.V., 1987. Antigenic cross reactivity  
between proteins and peptides: new insights and aplications. TIBS  
12:237-240.

52.- Karplus,M., Mc.Cammon,J.A. 1983. Dynamics of proteins:  
Elements and function. Ann. Rev. Biochem. 53:263-300.

53.- Merrifield, R.B. 1963. Solid-phase peptide synthesis.I.  
The synthesis of a tetrapeptide. J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154.

54.- Atherton,E., Clive,D.L.J. y Sheppard,R.C. 1975. Polyamide  
supports for polypeptide synthesis. J. Amer. Chem. Soc. 97:6584-  
6585.

55.- Arshady,R., Artherton,E., Clive,D.L.J. y Sheppard, R.C.  
1981. Peptide synthesis. Part 1. Preparation and use of polar  
supports based on poly(dimethylacrylamide). J. Chem. Soc. Perkin I:

529-537.

- 56.- Artherton, E., Longan, C.J. and Sheppard, R.C. 1981. Peptide Synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N-Fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. J. Chem. Soc. Perkin I: 538-546.
- 57.- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. y Calva, E. 1987. Isolation of an omp C-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. Gene 61: 75-83.
- 58.- Venegas, A., Gómez, I., Zavor, I. y Yudelevich, A. 1988. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* omp C porin gene. Nucleic Acids Res. 16:7721.
- 59.- Novotny, J., Bruccoleri, R., Karplus, M. 1984. An analysis of incorrectly folded protein models: implications for structure predictions. J. Mol. Biol. 177:787-818.
- 60.- Chou, P.Y., Fasman, G.D. 1974. Prediction of protein conformation. Biochemistry 13:222-245.
- 61.- Rivier, J., McClintock, R., Galyean, R. y Anderson, H. 1984. Reversed-phase high performance liquid chromatography: Preparative purification of synthetic peptides. J. Chrom. 288:303-328.
- 62.- Rajendra, W. 1987. High performance liquid chromatographic determination of aminoacids in biological samples by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. J. Liquid Chromatogr. 10:941-955.