

C3072

10  
25j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CLONACION Y EXPRESION DEL FRAGMENTO C DE LA  
TOXINA TETANICA EN *ESCHERICHIA COLI*.

Tesis que presenta María Elena  
Munguía Zamudio para obtener el  
grado de Maestro en Biotecnología

TESIS CON  
FALLA LE CINGEN

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

1992



## **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**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I INTRODUCCION GENERAL</b>                                  | <b>1</b>  |
| <b>II CARACTERISTICAS DE LA TOXINA TETANICA</b>                | <b>1</b>  |
| a) Modo de acción  | 3         |
| b) Fragmentos generados de la toxina y su relación funcional   | 5         |
| <b>III CARACTERISTICAS GENERALES DE NUEVAS VACUNAS</b>         | <b>7</b>  |
| <b>IV EXPRESION DE PROTEINAS HETEROLOGAS EN <i>E. COLI</i></b> | <b>9</b>  |
| <b>V MUTAGENESIS</b>   | <b>11</b> |
| <b>JUSTIFICACION</b>   | <b>15</b> |
| <b>ANTECEDENTES</b>  | <b>17</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>   | <b>18</b> |
| <b>MATERIAL</b>  | <b>19</b> |
| <b>METODOS</b>   | <b>21</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>                                  | <b>29</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>47</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>48</b> |

## Resumen

Se planteó la producción de un inmunógeno sustituto del toxoide tetánico, mediante la expresión de un fragmento atóxico e inmunogénico de la toxina respectiva, utilizando DNA recombinante. El Fragmento C de la toxina cumple con estos requisitos por lo que se intentó expresarlo en E. coli. Se ha observado una baja expresión de la proteína en concordancia con otros grupos de investigación y esto parece deberse a que la frecuencia y distribución de codones poco utilizados por E. coli, existen abundantemente en este gene. Se diseñaron una serie de manipulaciones en el gene que pudieran mejorar la expresión, algunas de las cuales son mutagénesis dirigida por oligonucleótidos que cambian algunos codones de pobre expresión por codones de alta expresión, sin alterar la secuencia primaria de la proteína; reintegrarle la parte carboxilo terminal del gene, utilizando la técnica de PCR; eliminar el remanente del Fragmento B acarreado desde el aislamiento inicial del gene; y la construcción con los señalamientos óptimos de transcripción y traducción del gene utilizando (PCR). Se hace una comparación del efecto que producen a nivel de expresión cada una de las manipulaciones. Se están caracterizando las construcciones a nivel de antigenicidad y protección.

# INTRODUCCION

## I. GENERAL.

La importancia de la toxina tetánica deriva primero del hecho que es capaz de producir todos los síntomas de la enfermedad clínica conocida como del tétanos y en segundo lugar del hecho que es hoy en día un problema de salud mundial, (1). Aunque la morbilidad y la mortalidad han decremado drásticamente en países desarrollados, sigue siendo un grave problema para los países en desarrollo. De hecho el tétanos causa la muerte un promedio de 140 veces más gente en los países pobres que en los ricos siendo el 80% de las muertes registradas en recién nacidos. La distribución geográfica del tétanos esta directamente relacionada a factores ecológicos y socioeconómicos, lo cual explica porque Africa, Asia y América Latina son las poblaciones más frecuentemente afectadas.

## II. CARACTERISTICAS DE LA TOXINA TETANICA.

La toxina tetánica es producida por la bacteria gram positiva, anaerobia estricta, *Clostridium tetani*, se produce esta al final de su fase de crecimiento llegando a constituir hasta el 10 % de la proteína total de *C. tetani*. Tiene la capacidad de esporular y es particularmente resistente a la mayoría de los antisépticos. La toxina tetánica intracelular esta constituida por un polipéptido de 150 Kd. Cuando esta es descargada al medio durante la autólisis de la bacteria, la hidrólisis por proteasas, resulta en una proteína extracelular constituida por dos cadenas, unidas por un puente disulfuro; la cadena pesada es de 100 Kd y la ligera de 50 Kd. La digestión con papaína de la toxina tetánica extracelular genera dos fragmentos: el fragmento B, el cual esta compuesto por la cadena ligera y la parte amino terminal de la cadena pesada, y el fragmento C que representa la región carboxilo terminal de la cadena pesada (figura 1). La secuencia del gene de la toxina muestra un contenido de [A + T] del 72.1%, es traducido a partir de un RNAm monocistrónico, y se sabe que el gene esta contenido en un plásmido, (2).

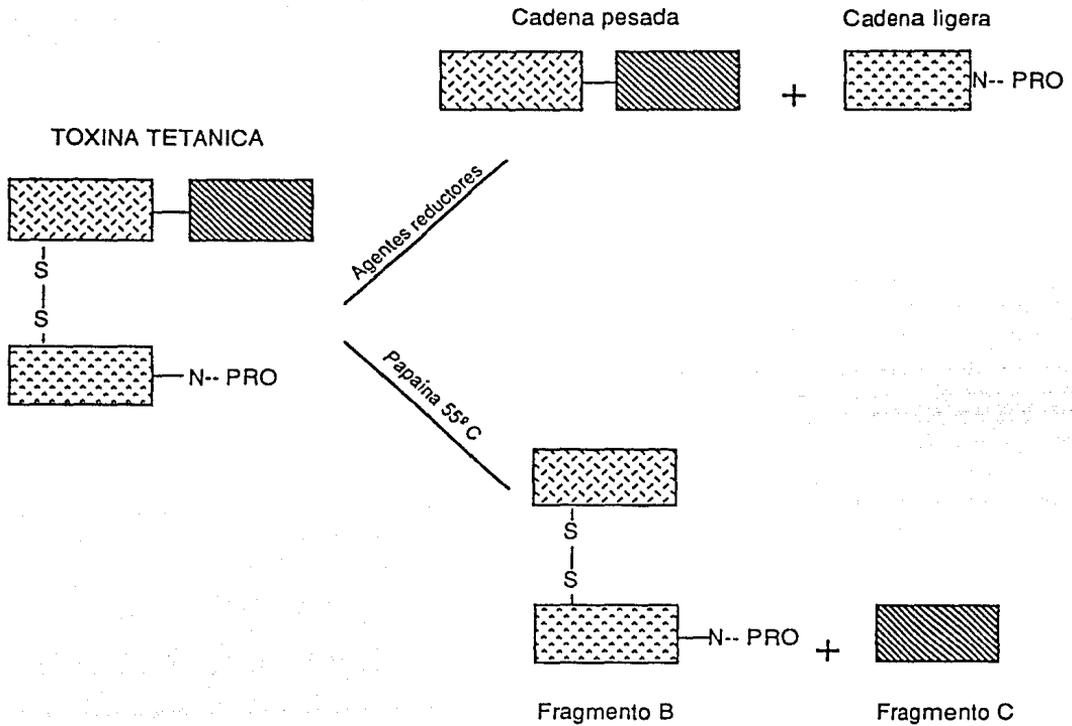


Figura 1. Estructura de la Toxina Tetánica y de los fragmentos generados bajo diferentes condiciones.

#### a) Modo de Acción.

El modo de acción de la toxina a nivel molecular no ha sido elucidado completamente. Se asume que la acción biológica de la toxina se ejerce por interferir con el mecanismo de liberación de los neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso central, causando desinhibición de las neuronas motrices de la médula espinal. (3). La primera etapa del mecanismo de acción de la toxina consiste en su unión mediada por una molécula receptora, a las terminales nerviosas motrices. Se ha sugerido que la toxina se une a gangliósidos del tipo GD2, GD1b y GT1 en las terminales nerviosas motrices y, posteriormente, es internalizada mediante endocitosis y transportada intraaxonalmente por el proceso de transporte retrógrado. Después de ser transportada a la sinapsis motora, la toxina causa la sinapsis continua de la neurona motriz. Hay evidencias de que la toxina actúa presinápticamente, afectando la liberación de neurotransmisores como 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 en este caso una parálisis flácida. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la toxina lleva a cabo esta compleja ruta y se están realizando estudios con respecto al 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 los neurotransmisores. Se sabe que estos son sintetizados en las terminales nerviosas y empacados en vesículas sinápticas. La liberación ocurre por exocitosis de la vesícula o de su contenido y parece depender de un incremento en la concentración de calcio axoplásmico durante la transmisión del impulso nervioso. Las fracciones 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 tipo 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 del neurotransmisor. Se ha demostrado que la toxina tetánica se une a la proteína tipo actomiosina, disminuyendo su actividad 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 actomiosina y la posterior exocitosis de la vesícula sináptica o de su contenido (4).

Se ha sugerido también que la toxina podría actuar mediante un efecto de metabolismo de los nucleótidos cíclicos. En la parálisis del 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 fosfodiesterasas (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 también involucrados 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 influencia sobre la liberación de los neurotransmisores.

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.

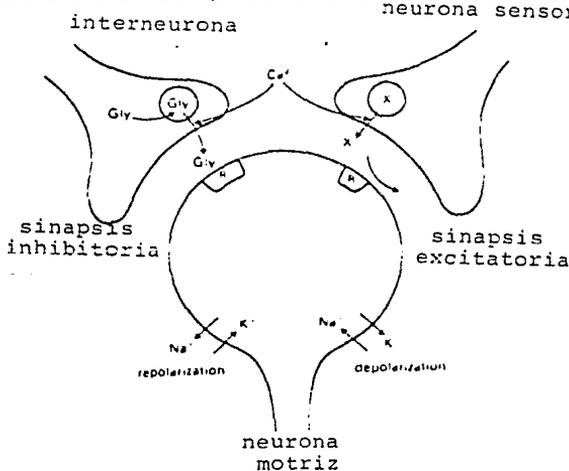


Figura 2. Sinapsis excitatoria e inhibitoria: liberación y acción de los neurotransmisores. Gly, glicina; R, receptores de neurotransmisores; X, compuesto no caracterizado (posibles candidatos: glutamato, dopamina, ATP, substancia P y somatostatina).

b) Fragmentos generados de la Toxina Tetánica y su relación funcional.

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: i) unión al receptor, ii) formación de poros en la vesícula endocítica y iii) 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. Se ha encontrado que, a 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 (5). Existe la hipótesis que la cadena ligera podría ser responsable de la actividad necesaria para la inhibición de la liberación de los neurotransmisores (4). 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 (6). 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 (7). 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. Se ha demostrado que el fragmento B, a pesar de tener determinantes antigénicos protectores, es capaz de producir a altas dosis síntomas diferentes al tétanos y curiosamente similares a la parálisis flácida producida por la toxina botulínica (8).

Como ya se ha dicho el fragmento C es un dominio de aproximadamente 453 aminoácidos, constituye la región carboxilo terminal de la proteína y se ha visto que en forma pura no es tóxico, se ha calculado que tiene un punto isoeléctrico alrededor de 8.5, contiene tres posibles regiones de determinantes antigénicos (según el perfil de Hoop). Se han inmunizado animales con esta región y se ha observado que es muy buen inmunógeno y protege contra la toxina tetánica, (9). También se han hecho estudios *in vitro* que nos indican que en este fragmento residen las regiones que interaccionan con los receptores neuronales que posteriormente permitirán la internalización del resto de la toxina. Por eso se describe que puede ser estudiado como un buen candidato a vacuna recombinante contra tétanos (figura 3).

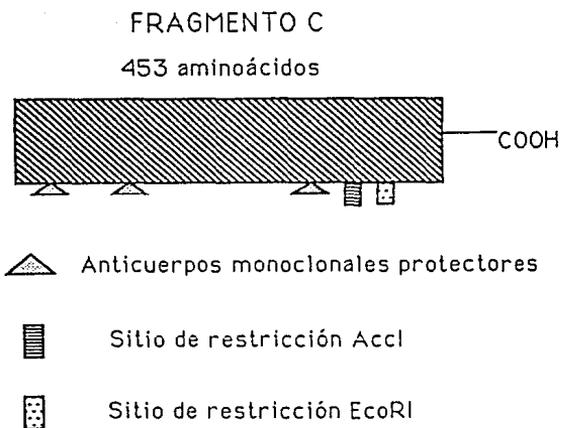


Figura 3. Fragmento C, región carboxilo de la toxina tetánica. Se señalan los anticuerpos monoclonales que se han identificado reconocen a este fragmento. Se indican los sitios únicos de restricción dentro del fragmento.

### III. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE NUEVAS VACUNAS.

Las vacunas ocupan un lugar importante en el sector salud. Las nuevas tecnologías en Biología Molecular, Inmunología e Ingeniería de Proteínas y Biotecnología permiten buscar un reemplazo más efectivo a vacunas ya existentes así como el desarrollo de nuevas vacunas contra enfermedades que nos aquejan en nuestros tiempos. Las vacunas como cualquier otra droga, tienen cierto efecto colateral indeseable; más aún en el caso de vacunas que son aplicadas a individuos saludables, la acción es particularmente riesgosa, por lo que hacer vacunas más seguras o más eficientes, abaratar el costo de la producción o la posibilidad de poder generar vacunas multifuncionales han sido algunos de los motivos para la implementación de metodologías modernas para la producción de vacunas novedosas. Se han logrado innovaciones como vacunas antiidiotipo y de subunidades antigénicas así como glicoproteínas recombinantes y polipéptidos que le dan una nueva perspectiva de mercado a ésta área, (10). La tecnología de DNA recombinante abre las posibilidades al desarrollo de estos productos con la identificación de determinantes antigénicos protectores que facilitarán el posterior aislamiento y manipulación de las regiones de los genes de estos determinantes que permitirán la producción masiva del producto y la manipulación necesaria para su purificación homogénea, lográndose en algunos casos el aislamiento de todos los productos indeseables ya sea de la misma proteína o de otro producto del huésped original. Además el aislamiento de diferentes determinantes permitirá la posibilidad de producir vacunas polivalentes contra uno o más patógenos. Uno de los problemas más 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 éstos generan. Sin embargo, 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 humoral como al sistema celular. La presencia de péptidos sintéticos capaces de estimular células B o células T del sistema inmune podrían llegar a imitar de manera eficaz la potencia que presenta el complejo epitope-proteína acarreadora. Con esto y el desarrollo de nuevos adyuvantes nos podemos dar una idea del avance que tendrá la nueva generación de vacunas (figura 4, (11)).

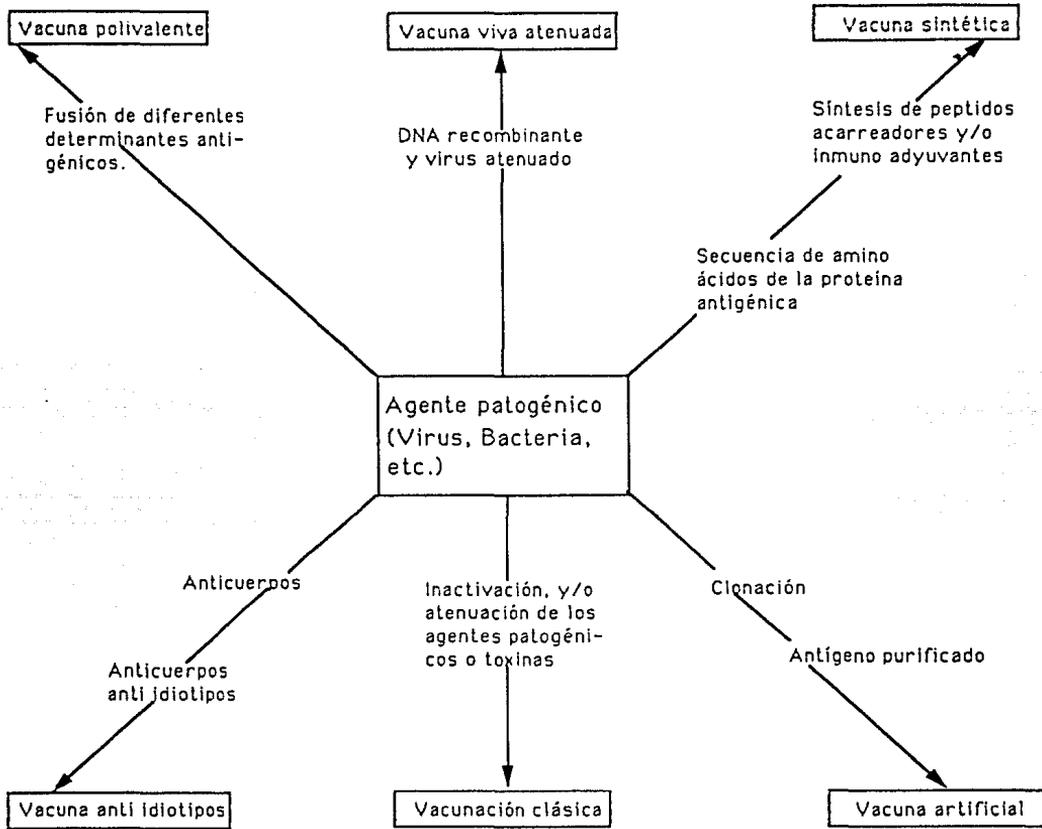


Figura 4. Métodos de preparación de vacunas. La vacunación clásica se le administra al paciente el patógeno inactivado o atenuado, el cual estimula la respuesta sin, en principio, causar la enfermedad. El anti-idiotipo provee un método alternativo. Estos son anticuerpos formados contra el sitio de enlace del anticuerpo, y por lo tanto, en términos de características de superficie a su propio sitio de unión, una copia directa del sitio del antígeno en el patógeno. El resto de los métodos requiere manipulación genética moderna y técnicas relacionadas, particularmente en la producción de cDNA.

#### IV. EXPRESION DE PROTEINAS HETEROLOGAS EN *E. COLI*.

La posibilidad de separar genes y expresarlos en otras especies se ha incrementado drásticamente a finales de esta década, con el fin de producir la proteína respectiva, ya sea para estudiar su estructura y función o para su posible uso farmacéutico así como para modificar o diseñar proteínas creándoles nuevas funciones, (12).

Altos niveles de expresión de numerosas proteínas eucarióticas y procarióticas se han logrado con la ayuda de la tecnología de DNA recombinante, (13) el hospedero mas utilizado es *E. coli*. Existen muchas razones para seleccionar a este organismo como productor de ciertas proteínas heterólogas: el conocimiento amplio acerca de sus aspectos genéticos, fisiológicos y bioquímicos; el crecer a altas densidades en medios simples y de bajo costo; el ser un organismo inocuo para fermentaciones a gran escala y la habilidad para expresar proteínas, (14) son algunas de las razones por las que se considera que es un microorganismo de fácil manipulación que ha ayudado a la investigación en muchas disciplinas y ha permitido la comercialización a gran escala de algunas proteínas. Con la selección de un adecuado sistema de expresión el cual requiere el uso de plásmidos multicopia con un fuerte promotor y un eficiente sitio de unión a ribosomas y la iniciación adecuada se logra obtener un alto nivel de expresión, como ha sido el caso de la eficiente producción de la Hormona de Crecimiento Humana, algunos péptidos de la toxina de la Difteria o la adecuada síntesis de la proteína *dam* y la proteasa del poliovirus 3C, (15, 16, 17, 18, 19, 20). Por otra parte, existen casos en los cuales se obtienen muy bajos niveles de síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli*. Se pueden considerar diversas causas entre las que destacan: 1) la proteína es inestable en *E. coli* y es rápidamente degradada por proteasas o 2) el RNAm no es eficientemente traducido. El primer caso se presenta más frecuentemente en proteínas de bajo peso molecular y se ha solucionado el problema con la creación de poliproteínas, proteínas de fusión (21, 22) o el uso de mutantes de *E. coli* deficientes en proteasas, (23, 24). El segundo caso esta en función de la tasa de iniciación o elongación traduccional del RNAm participando factores como enzimas, cofactores, abundancia de tRNAs y codones preferencialmente utilizados por el microorganismo.

Se considera que estas últimas son los principales motivos en la mayoría de los casos. Se sabe que procariontes y eucariontes presentan marcadas diferencias en la preferencia de codones para la síntesis de sus proteínas de alta expresión y se ha propuesto que este fenómeno puede ejercer un papel modulador en la expresión de los genes, (25, 26). La teoría adaptativa que explica este fenómeno nos dice que existen diferencias cinéticas intrínsecas en el uso de codones, (27, 28) y que hay una relación entre el uso preferencial de codones y la abundancia de tRNAs en el microorganismo (29, 30, 31, 32, 33, 34) que hace que para aquellos codones raros o poco usuales exista una baja proporción de tRNAs. Esto, a su vez, produce un arresto temporal y constante del ribosoma en estas regiones, provocando abortos de la traducción. Además la distribución cercana o regionalizada de estos codones poco frecuentes a lo largo del gene, así como el contexto en el cual se encuentren estos, se ha visto que contribuye al abatimiento en la eficiencia traduccional (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41).

Se ha observado que algunas proteínas que tiene un uso de codones poco usual para *E. coli* tiene un bajo nivel de expresión en ésta, y varios investigadores han reportado que el cambio de estos codones por óptimos o más utilizados por *E. coli* mejora notablemente la expresión. Tal es el caso del gene del Factor de Crecimiento tipo Insulina, o el gene de la Mioglobina del cachalote o el gene de Interleucina-2. También se reportan casos en los cuales es suficiente con cambiar aquellas regiones en las cuales estos codones poco usuales se encuentren cercanos como es el caso de la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa o  $\beta$  Galactosidasa (38, 42, 43, 44, 41).

## V. MUTAGENESIS.

Los avances recientes en mutagénesis han dado una nueva arma poderosa para estudiar la estructura, función y sobreproducción de las proteínas. En especial, la mutagénesis sitio dirigida ha permitido la construcción de genes para su expresión en células eucarióticas y procarióticas donde se les diseña los señalamientos adecuados para su fácil producción. Las mutaciones específicas son típicamente introducidas por hibridación de un oligonucleótido sintético conteniendo la mutación deseada al DNA silvestre. Los métodos difieren en los sistemas de selección usados para recuperar el DNA mutagenizado y la manera de sintetizar *in vitro* la hebra mutante. Las técnicas comúnmente utilizadas para esto es la mutagénesis por extensión del primer la cual consiste en tener la región blanco a mutagenizar en forma de cadena sencilla y agregarle el o los oligos mutantes, permitiendo el alineamiento y después la polimerización y circularización de la cadena mutante que al ser transformada al hospedero nos permitirá seleccionarla por el método adecuado (figura 5).

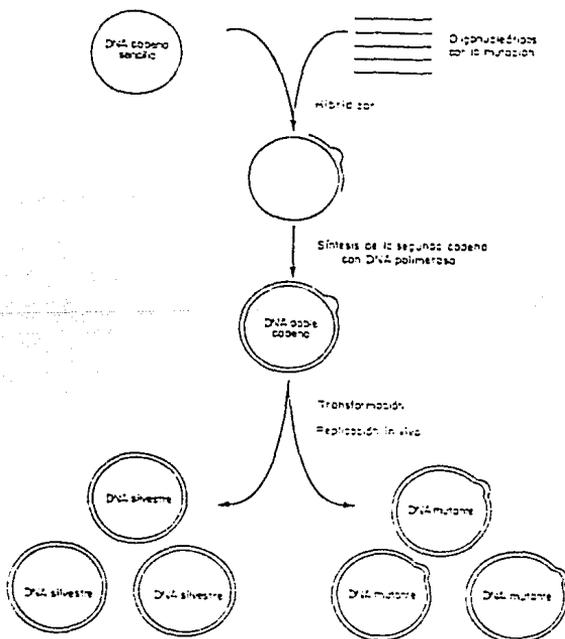


Fig 5 Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos

Tal es el caso del método de Kunkel, el método de Eckstein y el de PCR (Reacción de polimerización en cadena). Se ha visto que para los dos primeros la eficiencia de mutagénesis puede ser desde un 13% hasta un 90% de mutantes dependiendo de las condiciones del método (45, 46, 47, 48, 49).

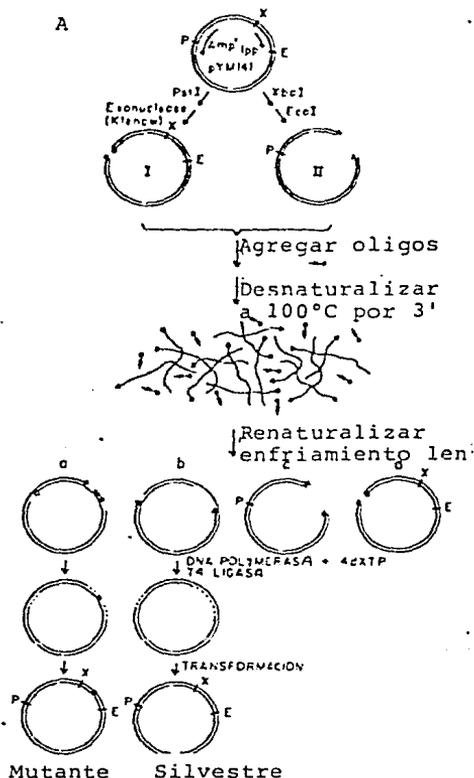


Figura 6. Esquema de la mutagénesis sitio dirigida. Se tiene el área blanco en forma de cadena sencilla, se realiza el alineamiento y se permite la hibridación lentamente, se liga y se transforma para su posterior selección.

En el caso de PCR se rige básicamente bajo los mismos principios de mutagénesis, aunque presenta algunas variaciones. En este caso no es necesario tener al DNA a mutar en forma de cadena sencilla, se requieren dos oligos y se obtiene la amplificación exponencial del fragmento mutado por medio de una serie de ciclos a altas temperaturas. En la mayoría de los casos se obtiene una eficiencia de mutación del 98 % (50), aunque el mayor problema de esta técnica radica en la probabilidad de introducir una segunda mutación no deseada, (51).

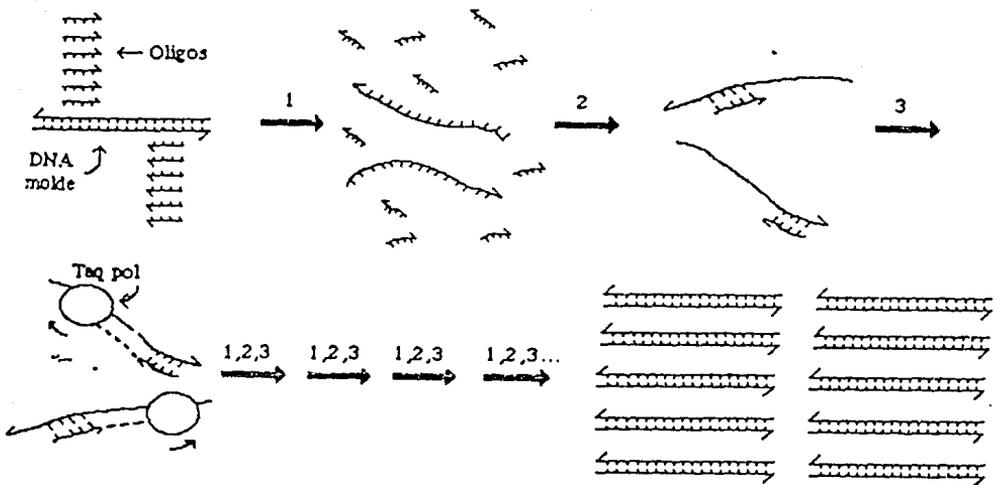


Figura 7. Mutagénesis por reacción de polimerización en cadena (PCR).

Por último, se puede mencionar, la mutagénesis por cassette, la cual consiste en la clonación de la región sintética mutante presentando una eficiencia de mutación del 100%. Sin embargo, este es un proceso costoso e impone una serie de límites prácticos en la síntesis de los oligonucleótidos.

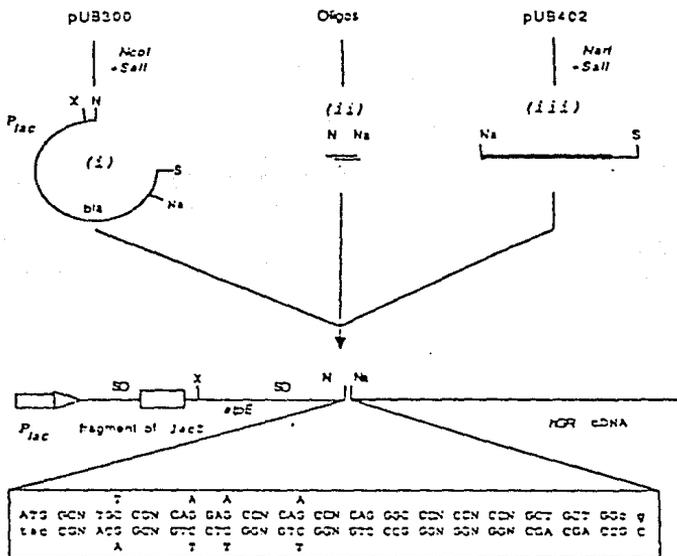


Figura 8. Mutagénesis por cassette.

## JUSTIFICACION

La Gerencia General de Biológicos, dependencia de la Sría. de Salud, es la encargada de producir entre otras, la vacuna tetánica con la cual se inmuniza a la Población Mexicana. Se obtiene por un largo proceso que requiere de un costoso medio de cultivo, condiciones de seguridad estrictas de lugares y personal y laboriosas pruebas de toxicidad antes de salir al mercado. Su producción se basa en el principio de detoxificación de la toxina (52), sin eliminar sus propiedades inmunogénicas. La preparación del toxoide tetánico consiste en el tratamiento con formaldehído de la toxina semipurificada. El toxoide así producido posteriormente pasa por varias etapas de purificación por filtración. El tratamiento con formaldehído bajo las condiciones usadas para producir el toxoide, da como resultado la formación de enlaces metilénicos tanto intramoleculares como intermoleculares. Al formarse estos últimos, se 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 el toxoide contra la 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.

Generalmente 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 la 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 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 ( ver objetivos) ya que su producción se llevaría a cabo en un huésped de características inocuas, el aparato de seguridad necesario durante la producción convencional podría ser reducido a un mínimo. Otra ventaja que se hace patente con la producción de una vacuna alternativa de naturaleza no tóxica, consiste en la producción de lotes mas homogéneos en comparación a los producidos por el método convencional. Ya que la producción de la vacuna alternativa no dependería de etapas de detoxificación del producto y se evitaría una fase que es importante para la calidad del producto convencional.

Finalmente se presentan ciertas reacciones secundarias 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 pudieran ser la causa de los fenómenos de hipersensibilidad presentados.

A las consideraciones anteriores se une el que, este proyecto nos permitió establecer interacción con grupos del sector salud, encargados de la producción de vacunas, y así propiciar los enfoques nuevos al desarrollo de estas, que sean de interés nacional.

## ANTECEDENTES

La Gerencia General de Biológicos nos suministró una pastilla celular congelada de *Clostridium tetani* para realizar el aislamiento total de DNA de la bacteria. En nuestro laboratorio, Joel Osuna, con la utilización de hibridación tipo Southern pudo aislar el gene del fragmento C con oligonucleótidos homólogos como sondas diseñados de acuerdo a la secuencia nucleotídica reportada. Debido a que no se encontraban sitios de restricción accesibles que flanquearan el gene completo se tuvo que aislar con 200pb adicionales del fragmento B y sin 280 pb de la parte terminal del gen, que es la parte carboxilo de la proteína. Esto con el fin de no traerse material genético adicional de la bacteria que pudiera resultar tóxico. Este fragmento de DNA de aproximadamente 1400 pb se clonó como proteína de fusión en varios vectores de expresión, bajo diferentes promotores como Trp, pL y Lac. Sin embargo por cuestiones prácticas y de accesibilidad se decidió trabajar con la construcción obtenida en el vector multipropósito pUC12, bajo los señalamientos del operón de Lac, ya que se obtenían resultados reproducibles. Se caracterizó la construcción a nivel de secuenciación de DNA, expresión e inmunodetección de la proteína.

La expresión de la proteína de fusión bajo condiciones de inducción fue monitoreada en geles de poliacrilamida SDS teñido con azul de Coomassie. Se observó que no se presentaba ninguna banda del peso molecular esperado por lo que se recurrió a la expresión de proteínas en minicélulas incorporando al medio metionina radiactiva con  $^{35}\text{S}$ . La aparición de una banda con el peso molecular de la proteína esperada nos permitió suponer que pertenecía al fragmento C. La detección inmunológica por hibridación tipo Western con anticuerpos monoclonales evocados en ratón contra este fragmento (donados por Habig et al., 9), nos permitió observar una débil señal perteneciente al producto esperado. Paralelamente otros grupos estaban tratando de expresar un fragmento similar al utilizado por nosotros reportando también bajos niveles de expresión de la proteína. Adicionalmente se sabe por reportes de otros grupos que aún expresando este fragmento bajo diversos promotores de *E. coli* y propios de *C. tetani* no se obtienen cantidades suficientes de expresión para realizar pruebas biológicas. Simultáneamente se reportaban experimentos *in vitro* de transcripción y traducción utilizando el sistema Sp6, (2) donde se observan productos abortivos similares a los obtenidos en su expresión *in vivo*. Lo anterior nos hizo suponer que el problema radica a nivel de traducción. Se hizo un análisis del uso de codones de este fragmento con respecto al utilizado por *E. coli*, observando que es muy diferente, y particularmente refleja todas las características de los genes poco expresados en *E. coli*.

## OBJETIVOS

**Objetivo General.**

Expresar un segmento atóxico y protectorio de la toxina tetánica que pudiera ser utilizado como sustituto de la vacuna convencional.

**Objetivos particulares.**

- Obtener y optimizar la expresión del Fragmento C de la Toxina Tetánica en un sistema de expresión de fácil manipulación en el laboratorio.
- Seleccionar y modificar por técnicas de Ingeniería Genética aquellas regiones en el gene del fragmento C que pudieran afectar drásticamente la traducción de la proteína sin alterar su estructura primaria ni su antigenicidad.
- Comparar a nivel de expresión las diferentes manipulaciones obtenidas en el gene del fragmento C.

## MATERIAL

**CEPAS****GENOTIPOS**

DH5

SupE44, lac U169 ( 80 lacZM15), hsd R17  
recA, endA1, gyrA96, thi-1re1A1.

JM101

SupE thi, (lac-proAB) F<sup>+</sup> traD36 proAB lac  
lq lacZM15**PLASMIDOS**

pBSM13

Vector que contiene el origen de replicación  
de DNA de M13. Derivado del plásmido pUC  
que contiene los promotores del  
bacteriofago T3 y T7, y lac tienen  
resistencia a ampicilina. (Stratagene).

pBR327

Derivado de pBR322.

**BACTERIOFAGO**

M13mp19

Fago filamentoso derivado  
de M13 con multisitio de  
clonación.

**ENZIMAS***Endonucleasas*

HindIII, SacI, BamHI  
EcoRI, PstI, AccI

**DISTRIBUIDORES**

New England Biolabs y  
Boehringer Mannheim.

*Modificadoras*

Ligasa T4, Cinasa,  
Polimerasa I (fragmento  
Klenow.

New England Biolabs

Secuensa 2.0

United States Biochemical (USB)

Fosfatasa alcalina Intestinal  
(CIP), Taq DNA polimerasa.

Promega

**REACTIVOS**

Deoxinucleótidos y dideoxi-  
nucleótidos.

Pharmacia Molecular Biological.

Anticuerpo Monoclonal  
anti-fragmento C.

Boehringer Mannheim

Los reactivos para electroforesis  
transformación, purificación,  
inducción e inmunodetección.

Bio-Rad, Sigma, BRL, Merck  
y Baker.

## METODOS

## 1) PURIFICACION Y MANIPULACION DE DNA DE PLASMIDO.

Para la manipulación de DNA de plásmido, fásmido y fago se siguen las técnicas reportadas por Maniatis et. al. (53). Para los microensayos de DNA se sigue el método de lisis alcalina descrito por Rodriguez et. al. (54). Si se requiere un DNA más puro se utiliza un equipo de reactivos (GeneClean), de la casa comercial BIO 101, siguiendo las instrucciones del equipo.

## 2) TRANSFORMACION.

### a) Método químico:

Se utiliza el método químico reportado por Chung et al. (55) que consiste en: Se crece en 30ml de medio Luria la cepa de *E. coli* a una densidad de 0.4 a 0.5 OD<sub>550nm</sub>. Se pasa a hielo y se centrifuga a 6000rpm durante 8 min. Se decanta y se agregan 3ml de amortiguador TSS 1X (10% polietilenglicol; 5% dimetil sulfoxido; 50mM MgCl, medio Luria), frío y filtrado. Se resuspenden las bacterias y se hacen alicuotas de 0.2ml y se congelan en hielo seco. Se descongelan las alicuotas necesarias en hielo y se agrega de 1 a 20 ng de DNA sp.. Se deja 30 min. Se recuperan en un tubo de 13x160mm más 0.8ml de Luria en agitación a 37°C de 30 a 60 min. Se platea de 0.1 a 0.3ml en cajas con medio Luria sólido y el antibiótico correspondiente.

### b) Electroporación.

Se utiliza el método reportado por Dower et al. (56), el cual consiste: Se crecen las bacterias en medio Luria a 37°C con agitación hasta una densidad de 0.5 a 1.0 ABS<sub>600</sub>. Se pasan a hielo y se centrifugan a 4000xg por 15 min. a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se resuspenden en el mismo volumen de agua o 1mM de Hepes pH7 frío y estéril. Se centrifuga como arriba . Se resuspende 1\2 del volumen y se centrifuga. Se resuspende en un 1\50 del volumen de glicerol al 10%. Se centrifuga y finalmente se resuspende en 1\500 del volumen de glicerol al 10%. La suspensión concentrada es distribuída en alicuotas de 45µl, congeladas y guardadas a -70°C.

Se descongelan las alicuotas necesarias a temp. amb. y después se pasan a hielo. Se agrega de 1 ó 20pmol de DNA en amortiguador de baja fuerza ionica. Se mezcla

bien y se deja en hielo 1min. Se pasa a la celda de electroporación de 0.2cm y se coloca en la camara del electroporador (modelo 1652075 Bio-Rad). Se aplica un pulso de 12.5 kV/cm con una constante de tiempo de 4.5 a 5 mseg.. Inmediatamente se agrega 1 ml de medio SOC (2% bacto triptona; 0.5% extracto de levadura; 10mM NaCl; 2.5mM de KCl; 10mM MgCl; 10mM MgSO<sub>4</sub> ; 20mM glucosa) a temp. amb. a la celda y suavemente pero rápidamente resuspende las bacterias con una pipeta Pasteur. Se transfiere la suspensión celular a un tubo de 17 x 100 mm y se incuba a 37°C con agitación durante 1hr. Se platea el volumen necesario en medio sólido con antibiótico.

### **3) ELECTROFORESIS DE DNA.**

Se siguen las condiciones descritas por Maniatis et. al. (53) en lo que respecta a electroforesis de geles nativos y desnaturizantes de agarosa y acrilamida para DNA.

### **4) PRODUCCION DE DNA DE CADENA SENCILLA.**

Para la obtención y purificación del DNA en forma de cadena sencilla del fásmido pBSM13-, se siguió el protocolo reportado por la casa distribuidora Stratagene.

### **5) SECUENCIACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA.**

Se realiza de acuerdo al método de Sanger et al. (57). Se utiliza el equipo de reactivos de secuencia de United States Biologicals (USB). Para el caso de DNA de doble cadena se desnaturizan 2µg de DNA sp. en 8µl de agua más 2µl de NaOH 2N, recién preparada, por 5 min. a temp. amb.. Se agregan 2µl de agua, 3µl de acetato de sodio 3M pH4.8; 5µl de oligo [5ng/µl] y 75µl de etanol absoluto se deja a -70°C por 10 a 15 min. Se centrifuga y se lava el precipitado con etanol al 70% de 2 a 3 veces. Se seca y se continúa el proceso de acuerdo a las instrucciones del manual de USB, descrito para DNA de cadena sencilla.

## 6) SINTESIS Y PURIFICACION DE OLIGONUCLEOTIDOS.

La síntesis es realizada en la máquina ( Sintetizador de DNA automatizado modelo Microsyn-1450 Systec) a partir de fosforoamiditos. La purificación se lleva a cabo por una separación electroforética del DNA en geles de poliacrilamida al 20 % con urea 8M se corta la banda perteneciente al oligo y se eluye en agua destilada toda la noche a 37°C. Se toma el sobrenadante y se liofiliza. La urea se quita con lavados de etanol absoluto. Se seca el precipitado y se resuspende para cuantificación y valoración biológica del oligo. La valoración biológica se lleva a cabo fosforilando radiactivamente con <sup>32</sup>P ATP el oligo de acuerdo a las instrucciones de Maniatis, (53). Se hibridiza con el templado en forma de cadena sencilla en una relación Molar de 1:10 de templado oligo se agregan los nucleótidos, el amortiguador de la polimerasa y la polimerasa I (frag. Klenow). Se polimeriza 15 min. a 37°C, se para la reacción a 65°C 10 min. Se toma 1/2 del volumen de reacción y se guarda. El resto del volumen se pone en una reacción de digestión con una enzima que tenga su sitio de reconocimiento en el lado opuesto al punto de hibridización del oligo. Se realiza una electroforesis con ambas reacciones y el gel se expone a una placa de rayos X.

## 7) MUTAGENESIS.

a) En algunos experimentos se utilizó el "Sistema de Mutagénesis oligonucleótido dirigida de acuerdo al método de Eickten (58). Los productos necesarios para llevarla acabo son proporcionados por un equipo que distribuye la casa Amersham y se siguen las indicaciones del equipo.

b) En otros se utilizó el método de mutagénesis multisitio dirigida usando la DNA T7 polimerasa reportado por Su Ti-Zi et al. (47), el cual consiste en: Se hibridiza el oligo mutagénico al DNA templado en forma de cadena sencilla y amortiguador de DNA T7 polimerasa. Se calienta a 65°C por 5 min. Se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Se pasa a hielo por 15 min. Se hace una reacción de extensión\ligación, a la mezcla anterior se agregan dNTPs, ATP, DNA T7 polimerasa y ligasa T4. Se incuban a 37°C por 15 min. Se para la reacción inmediatamente calentando a 65°C por 5 min. Se transforma el DNA a *E. coli*.

c) También se utilizó la reacción de amplificación en cadena (PCR), (50).

El templado de doble cadena a amplificar en forma lineal se le agregan los oligos mutagénicos que flanquean la región blanco, dNTPs; amortiguador de la Taq DNA polimerasa (según Promega), la DNA Taq polimerasa, agua destilada y aceite mineral. Las reacciones se realizan en un horno (Biosycler), haciendo ciclos de 92°C por 1.5 min., 55°C por 3 min. y 70°C por 1.5 min. repitiendo esto durante 20 a 30 ciclos. Al final se deja a 70°C por 15 min. para que termine de polimerizar los extremos. Las temperaturas de alineamiento y desnaturalización variaron dependiendo de la Tm de los oligos utilizados.

### **8) PREPARACION DE SONDAS RADIACTIVAS.**

De 10 a 20 picomolas del oligo apropiado se tratan con polinucleótido cinasa T4 en presencia de 50 a 100µCi de <sup>32</sup>P ATP en amortiguador cinasa (53), para eliminar la marca no incorporada se utilizan columnas de poliacrilamida (Biogel P-30 de Bio-Rad), la cual se prepara de acuerdo a las instrucciones del distribuidor. Se monta la columna con 1ml de resina y se equilibra con amortiguador TE (10mM Tris HCl pH 7; 1mM EDTA). Se centrifuga 1 min. a 1000rpms. Se agrega el oligonucleótido radiactivo en un volumen de 0.2ml. Se centrifuga en las mismas condiciones, se colecta la 1ª fracción, se vuelve agregar el mismo volumen de amortiguador TE y se repite la operación 3 veces. Se aplica 1\100 de las fracciones colectadas a un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se expone a una placa de rayos X. Se trabaja con la fracción donde halla salido el oligo sin marca libre.

### **9) HIBRIDIZACION EN COLONIA.**

Se realizó de acuerdo al método de Zoller et al. (59).

Se transfieren las colonias a discos de papel Whatman 540. Se desnaturalizan las bacterias en una solución de lisis (0.5 N NaOH; 1.5 NaCl) por 5 min.. Se neutraliza en una solución (1.5 NaCl; 0.5 M Tris HCl pH7.4) por 10 min. Se fija en etanol al 95%. Se dejan secar los filtros a temperatura ambiente. Se lavan los filtros con una

solución SSC 10x (20x: 3M NaCl; 0.3M Citrato de Sodio; 10mM EDTA pH 7.2) 3 veces por 10 min. c/vez. Se prehibridiza el filtro en una solución; 6x SSC; 10x Denhardt's (100x: 2% Seroalbumina bovina; 2% polivinil pirrolidina; 2% ficoll); 0.02% SDS y 150µg/ml de DNA de Arenque, durante 6 a 12 hrs. a 42°C. Se ponen a hibridar en una solución 6x SSC; 10x Denhardt's; 15 ó 25% de formamida; 150µg de DNA de Arenque y  $2-5 \times 10^6$  cpm de oligonucleótido sonda. Se deja por 2 a 3 hrs. a 37°C. Se lavan los filtros en 6x SSC tres veces a temp. amb.. Se exponen los filtros a un placa de rayos X. Los subsecuentes lavados se hacen calentando el 6x SSC hasta 10°C abajo de la  $T_m$  del oligonucleótido.

## 10) INDUCCION DE PROTEINAS.

Los cultivos de *E. coli* conteniendo los plásmidos respectivos fueron inducidos de acuerdo por Makoff et al. (22) excepto que el medio Luria contenía 200ug/ml de ampicilina. La inducción fue con IPTG, (se probó a diferentes condiciones; 0.25mM, 1mM y 2mM a tiempos de inducción de 2, 4, 6, 8 hrs. Se decidió trabajar a la concentración 1mM durante 4 hrs en agitación a 37°C. Se colecta lo equivalente a 5 U ABS<sup>620</sup> por mililitro y se procesan para su cuantificación.

## 11) PRODUCCION DEL FRAGMENTO C EN FERMENTADOR DE 10 L.

En 9 l de medio Luria se inocula con 1 l de cultivo crecido toda la noche de *E. coli* con la construcción deseada. Se agita a 400 rpm y 1 vvm en un fermentador (Labroferm) con dos impulsores distribuidos a 5cm del fondo del tanque y a 1.5 veces el diametro del impulsor, a 29° C durante 6 hrs.. Se cosecha la biomasa en una centrifuga Minisharples a 3542 x g. Se lisan las bacterias como se indica posteriormente.

## 12) RUPTURA CELULAR.

a) Sonicación (volumenes menores a 10ml).

Se resuspenden las bacterias colectadas en un amortiguador de lisis (50mM tris HCl pH7.5; 1mM EDTA; 2mM PMSF). Se sonicán a 12 micrones 3 veces o hasta que se clarifique el medio en pulsos de 20 seg.

b) Homogenizador (volumenes mayores de 500ml).

Se resuspenden las bacterias en el amortiguador antes mencionado y se pasan tres veces por el homogenizador de alta presión (Manton Gaulin, modelo 15M) aplicando una fuerza de 600 Kg/cm .

Las proteínas obtenidas por estos métodos se centrifugan a 5000xg por 5 min, se recupera el precipitado. Se resuspenden y se cuantifica la proteína por el método de Lowry, (62).

## 13) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.

Se realiza la electroforesis de acuerdo a lo reportado por Laemmli et al. (63). Se toman cantidades equivalentes de proteínas de las diferentes construcciones. Se agrega el amortiguador de lisis 2x (20% glicerol; 10% 2B Mercaptoetanol; 4.6% SDS; 0.125 M Tris HCl pH6.8; 0.1% azul de bromofenol). Se hierven 10 min. y se aplican al gel. Se corre a 50 V durante 4 a 6 hrs.

## 14) INMUNIZACION.

Se sigue el protocolo según Harlow et al. (64).

Se inocula un conejo subcutáneamente con 500µl de toxoide comercial. Se da un refuerzo a los 20 días con la misma dosis. Se sangra en el lobulo de la oreja a los 20 días. Se colectan 10 ml de sangre. Se deja cuagular por 30 -60 min. a 37°C. El cuagulo se separa de los contornos del tubo usando una pipeta Pasteur. Se deja el cuagulo a 4° C toda la noche para que se contraiga. El suero es removido del cuagulo

y cualquier material insoluble por centrifugación a 10000 x g por 10 min. a 4° C. Se guarda el suero a -20° C.

### 15) PREABSORCIÓN DEL SUERO CON *E. COLI*.

a) Absorción por columna de afinidad.

Se utiliza la resina Sepharosa 4B activada con Bromuro de Cianogeno de (Pharmacia), la cual se hincha y se equilibra de acuerdo a las indicaciones del manual de la casa distribuidora. Se deja pegando el extracto lisado de *E. coli* con el plásmido pBSM13- a la resina de acuerdo a lo reportado por Maniatis et al. (53). Se monta la columna y se equilibra con amortiguador TBS más 1mM de azida de sodio. Se pasa el suero por la columna. Se mide la absorbancia antes de aplicar y a cada fracción que se colecte.

b) Por precipitación del complejo.

Se lisa el extracto de *E. coli* de acuerdo a lo reportado por Maniatis (53). Se agrega un volumen de suero y uno de extracto lisado. Se deja toda la noche a 4°C. Se centrifuga y se colecta el sobrenadante.

c) Por inmunoblot.

Se realiza de acuerdo a lo indicado por Harlow (63).

Se desarrolla el inmunoblot hasta el paso del primer anticuerpo como se mencionó antes. Se corta uno de los carriles que lleva el antígeno de interés. El resto de la membrana se guarda en TBS más 0.02% azida de sodio a 4°C. La tira separada se procesa hasta la fase de revelado. Se alinea con el resto de la membrana y se corta en la región donde se encuentra el complejo antígeno anticuerpo de interés. Los trozos pequeños de membrana se cortan y se incuban en 100mM glicina (pH 2.5). Se remueve el amortiguador y se neutraliza con 1/10 de volumen de 1M tris pH8.

## **16) TITULACION DE ANTICUERPOS.**

Se realiza por hibridización en punto. Se agregan 10, 5 y 2.5µl de toxoide a una membrana de nitrocelulosa (S&S). Se deja secar. Se bloquea con leche descremada al 5% en amortiguador TBST (ver electrotransferencia) por 3hrs. a Temp. amb. con agitación. Se agregan diluciones desde 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:2000 del suero a titular en el mismo tipo de solución por 2hrs.. Se lava con amortiguador TBST y se continúa el proceso como se indica en la inmunotransferencia.

## **17) ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA.**

Se sigue el método reportado por Towbin et al. (65) para la transferencia de proteínas a un soporte sólido. Se electrotransfiere a 80 V por 12 hrs. con agitación a 4°C. Se bloquea el filtro con leche descremada al 5% en amortiguador TBST (10mM tris HCl pH8; 150mM NaCl; 0.05% Twien 20) toda la noche a 4°C. Se agrega el primer anticuerpo preabsorbido a una dilución de 1:500 en la misma solución antes mencionada durante 2 a 3 hrs. a temp. amb. y con agitación. Se lava el filtro con TBST tres veces 10 min. c/vez. Se agrega el segundo anticuerpo que es un conjugado, anti IgG de conejo acoplado con fosfatasa alcalina, (del equipo de reactivos "Protoblot" de la casa Promega), en TBST más leche descremada al 5% en una dilución de 1:7500 durante 1 a 2 hrs. a temp. amb. con agitación. Se lava el filtro como se menciona antes y se le agrega la solución reveladora, (100mM tris HCl pH9.5; 100mM NaCl; 5mM MgCl) por cada 10ml de esta solución agregar 66µl de NBT [50mg/ml] y 33µl de BCIP [50mg/ml] en formamida al 70%. Se deja a temp. amb. de 5 a 15 min. y se para la reacción con 1mM EDTA y agua destilada.

## **18) DETECCION POR ELISA.**

Se desarrolló de acuerdo a lo reportado por Harlow et al. (63). Se utilizaron diluciones de 25, 50 y 100ug de proteínas totales lisadas y cuantificadas como antes se mencionó. El primer anticuerpo fue el policlonal de conejo. El ensayo se desarrolló de acuerdo al protocolo de inmunotransferencia revelando con fosfatasa alcalina acoplada al segundo anticuerpo anticonejo y con el sustrato adecuado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El fragmento C fue clonado como proteína de fusión con el péptido alfa del operón de Lac en el plásmido pUC12, por Joel Osuna (66). Que generaría una proteína de 63 Kd. Este plásmido se transformó en cepas que sobreexpresan el represor de Lac, que reprimen completamente al operón, como: JM101 y CMK. Para valorar su expresión se crecieron cultivos en condiciones con y sin inducción con IPTG. Se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry (62) y fueron sometidas a electroforesis de acuerdo al método de Laemmli, (61) tiñendo con azul de Coomasie. No se observó la aparición de ninguna banda correspondiente a la proteína de fusión. Se pensó que podría haber sufrido alguna mutación que rompiera la fase de lectura de la proteína por lo que se decidió secuenciarla, subclonandola en el bacteriofago M13mp19. Esto nos permitió leer desde el promotor del operón de la proteína hasta el extremo carboxilo del fragmento C, (figura 9). No se encontró ninguna mutación o codón de terminación.

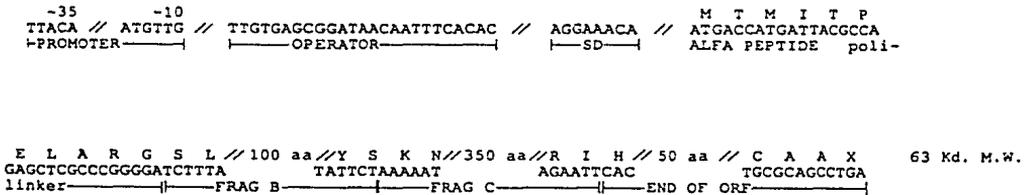


Figura 9.- Estructura de la proteína de fusión de TetC. Se muestran las secuencias de las señales de transcripción, traducción y la unión con el péptido alfa, así como las secuencias terminales del gene. La secuencia nucleotídica se obtuvo en la cepa DH5 $\alpha$ , con la ayuda del primer universal, que nos permite leer la región carboxilo de la proteína; de un oligo interno homólogo al gene, que nos permite leer los señalamientos de transcripción y traducción y el primer reverso que nos permite leer la parte amino de la proteína.

## Análisis del problema de expresión.

Se sabía por otros grupos; Eisel et al. (2), Fairweather et al., (67), Halpern et al. (68), que trabajan con el fragmento C expresado en *E. coli*, con construcciones similares a la nuestra, que éste tiene problemas de expresión. En algunos casos obtuvieron en proteínas de fusión sólo el 0.1% de las proteínas totales en condiciones de inducción. Como anteriormente se mencionó (ver antecedentes) es altamente posible que el problema radique a nivel de traducción, específicamente en el uso de codones, por lo que se decidió hacer un análisis del uso de codones que tiene este fragmento con respecto al utilizado por *E. coli*. Se realizó un análisis de las frecuencias del uso de codones, para varios genes, graficando como barras hacia abajo de (bajo uso) o hacia arriba (alto uso) y los puntos intermedios los de frecuencia regular. Se partió de los datos reportados por Grosjean et al., (32)(tabla 1).

TABLA 1.

|   | U   |     |     |     |       |     | C   |     |     |     |       |       | A     |     |     |     |       |      | G   |     |     |     |       |     |   |
|---|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-------|------|-----|-----|-----|-----|-------|-----|---|
|   | pol | pro | fac | mbr | r-pro | rep | pol | pro | fac | mbr | r-pro | rep   | pol   | pro | fac | mbr | r-pro | rep  | pol | pro | fac | mbr | r-pro | rep |   |
| U | Phe | 21  | 9   | 6   | 2     | 20  | Ser | 37  | 24  | 17  | 8     | 7     | Tyr   | 23  | 4   | 5   | 3     | 13   | Cys | 5   | 1   | 5   | 1     | 4   | U |
|   |     | 50  | 17  | 25  | 8     | 7   |     | 42  | 21  | 10  | 11    | 9     |       | 42  | 13  | 18  | 16    | 5    |     | 10  | 6   | 3   | 2     | 4   |   |
|   | Leu | 5   | 4   | 2   | 1     | 14  | 5   | 1   | 2   | 0   | 10    | ochre | 2     | 7   | 3   | 2   | 1     | cpol | 0   | 0   | 0   | 0   | 3     | A   |   |
|   |     | 9   | 3   | 3   | 1     | 14  |     | 5   | 2   | 1   | 0     | 11    | amber | 0   | 0   | 0   | 0     | 0    | Trp | 10  | 4   | 5   | 5     | 5   | G |
| C | Leu | 14  | 4   | 6   | 1     | 10  | Pro | 11  | 4   | 4   | 2     | 1     | His   | 7   | 4   | 4   | 2     | 14   | Arg | 101 | 46  | 42  | 14    | 14  | U |
|   |     | 23  | 3   | 7   | 0     | 13  |     | 0   | 1   | 1   | 0     | 8     |       | 31  | 9   | 15  | 4     | 9    |     | 55  | 24  | 14  | 4     | 29  |   |
|   | 3   | 0   | 0   | 0   | 3     | 13  | 6   | 3   | 3   | 5   | 16    | 8     | 5     | 2   | 25  | 0   | 0     | 1    | 0   | 11  | A   |     |       |     |   |
|   |     | 162 | 67  | 57  | 31    | 49  |     | 64  | 32  | 32  | 15    | 20    | Gln   | 63  | 26  | 31  | 21    | 33   | 0   | 1   | 0   | 0   | 10    | G   |   |
| A | Ile | 35  | 16  | 11  | 2     | 26  | Thr | 24  | 21  | 21  | 15    | 8     | Asn   | 5   | 4   | 3   | 1     | 19   | Ser | 4   | 4   | 2   | 0     | 8   | U |
|   |     | 115 | 37  | 67  | 17    | 19  |     | 60  | 21  | 30  | 11    | 22    |       | 70  | 32  | 26  | 24    | 14   |     | 26  | 7   | 9   | 6     | 18  |   |
|   | 0   | 1   | 1   | 0   | 4     | 4   | 3   | 5   | 1   | 3   | 52    | 37    | 51    | 27  | 21  | 0   | 1     | 1    | 0   | 0   | A   |     |       |     |   |
|   |     | 69  | 24  | 27  | 10    | 22  |     | 16  | 2   | 8   | 1     | 11    | Lys   | 44  | 28  | 33  | 5     | 10   | 0   | 1   | 0   | 0   | 5     | G   |   |
| G | Val | 66  | 47  | 35  | 22    | 15  | Ala | 32  | 75  | 23  | 32    | 11    | Asp   | 72  | 14  | 17  | 5     | 30   | Gly | 89  | 44  | 47  | 27    | 15  | U |
|   |     | 25  | 8   | 5   | 2     | 16  |     | 22  | 13  | 10  | 2     | 31    |       | 53  | 31  | 40  | 22    | 27   |     | 58  | 35  | 44  | 17    | 17  |   |
|   | 29  | 42  | 17  | 10  | 6     | 33  | 42  | 21  | 17  | 14  | 167   | 58    | 69    | 4   | 30  | 0   | 1     | 3    | 0   | 6   | A   |     |       |     |   |
|   |     | 41  | 17  | 19  | 3     | 23  |     | 56  | 27  | 31  | 6     | 34    | Glu   | 58  | 15  | 22  | 5     | 21   | 0   | 0   | 5   | 0   | 18    | G   |   |

### Uso de codones en genes altamente expresados y débilmente expresados en *E. coli*.

El número total de codones usado en 23 RNAm correspondientes a proteínas abundantes en *E. coli*, (columnas de la 1 a la 4). En la última columna (rep), se presentan los datos acumulados para 4 proteínas represoras expresadas débilmente por *E. coli*. El símbolo pol corresponde a RNA polimerasas, incluye el gene completo de *rhoD*, *rhoB*, parte del gene *rhoC* y *rhoA*. El símbolo r-pro, corresponde a proteínas ribosomales, incluye los genes completos para proteínas como S12, L11, L1, L10 y L7/12, también como porciones de los genes de proteínas como: S4, S7, S11, S13, L14 y L16. El símbolo fac pertenece a factores como *tufA*, factor EF-G, IF3, también incluye al gene de *RecA*. El símbolo o-mbr corresponden a proteínas de membrana externa, incluye lipoproteínas, proteína *lamB*, proteína *ompA* II. El símbolo rep corresponde a proteínas de represores como: el gene *LacI*, el gene *trpR*, el gene *araC* y el represor codificado por Tn3. Los valores indican la frecuencia de ocurrencia de cada codón para los diferentes grupos de RNAm. Los valores en letra gruesa indican la preferencia del codón. Las flechas indican el codón modulador correspondiendo a (interacciones débiles) o tRNAs menores.

Se realizó una comparación de las gráficas obtenidas para proteínas de alta expresión, una de baja expresión y del fragmento C, (figura 10). Se observó que este último contiene un gran número de codones de bajo uso, lo cual, aunado a la abundancia de estos en ciertas regiones, se espera que abata aún más la traducción de la proteína, (29). Se ha reportado que cuando se cambian algunos de estos codones de bajo uso muy cercanos por codones de alto uso para *E. coli* se puede mejorar la expresión de la proteína como en el caso de  $\beta$  galactosidasa o la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (37, 41).

Gene de la RNAPolimerasa "rpo D" (alta expresión)



Gene de represor de arabinosa "ara C" (baja expresión)



Gene del fragmento C de la toxina tetónica.

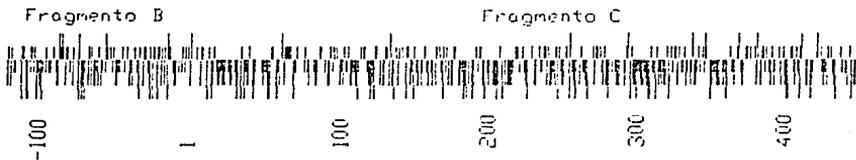


Figura 10. Gráfica del uso de codones de diferentes genes de proteínas expresadas en *E. coli*. Proteína de alta expresión como la (rpoD). Proteína de baja expresión como araC, que es un inhibidor de la síntesis del operón de los amino ácidos aromáticos. El fragmento C de la Toxina tetónica. Se puede observar la abundancia de codones poco usuales en este último gene.



nos permitió eliminar la mayor parte del fragmento B que se había traído desde el aislamiento inicial a partir de DNA total de *Clostridium tetani* (66). El oligonucleótido (2) de 33 pb contiene dos mutaciones diseñadas para sustituir el codon ATA por el de ATC que codifican para Isoleucina y el codon CTA por el de CTC que codifica para leucina. El oligonucleótido (3) de 36pb contiene 5 mutaciones y cambia AGG por CGT y AGA por CGT que codifican para glutámico y ATA por ATC que codifica para isoleucina.

### Clonación en el vector pBSM13-

Se decidió clonar el fragmento C en un vector que nos permitiera obtener el DNA en forma de cadena sencilla para realizar la mutagénesis y a su vez nos permitiera probar la expresión de las proteínas mutantes, (70). Se decidió utilizar el vector tipo "pBSM13-" el cual contiene el origen de replicación del fago M13, el gene de la  $\beta$ Lactamasa que da resistencia a ampicilina, el multisitio de clonación de mp18 y el operón de Lac. Para este efecto se sustituyo el fragmento pequeño, producto de la digestión con PvuII del vector pBSM13-, por el segmento equivalente, que contiene el fragmento TetC, proveniente del vector m13mp19 (figura 12). La generación de la cadena sencilla de este vector se realizó siguiendo el protocolo reportado por la casa distribuidora.

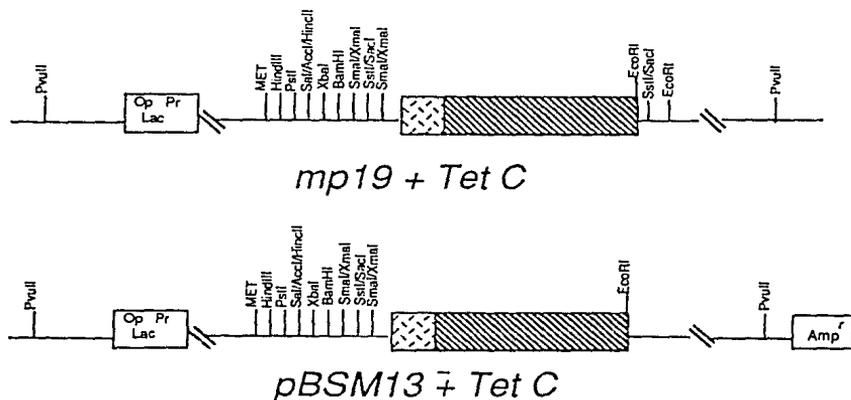


Figura 12.- Construcción obtenida en el fósforo pBSM13<sup>-</sup>. La región que contenía el fragmento C fue obtenida por la digestión con la enzima de restricción PvuII del fago m13mp19 y se sustituyo por la región que se genera con la misma enzima en este fósforo.

### Generación de mutaciones silenciosas que mejoran el uso de codones.

La mutagénesis con los oligos (2) y (3) se obtuvo utilizando el equipo de reactivos de "Mutagénesis Sitio Dirigida por Oligonucleótidos" de la casa Amersham, que se basa en el método de mutagénesis reportado por Eckstein, (58) (figura 13) y sobre este templado mutante se realizó la mutagénesis con el oligo (1) en el cual se utilizó la técnica de mutación por polimerasa T7 (47).

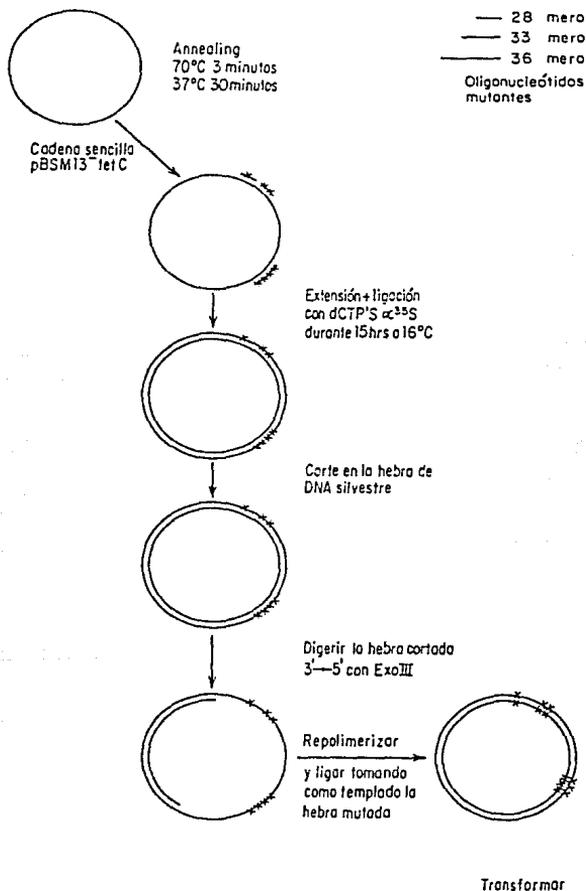


Figura 13.- Mutagénesis sitio dirigida por oligonucleótidos. La generación del DNA de cadena sencilla del fásmido pBSM13TetC se obtuvo de acuerdo a las indicaciones de la casa distribuidora.

La selección de mutantes se hizo por hibridización en colonia de acuerdo a lo reportado por Smith et al., (46) y Berent et al., (71) con el uso de los mismos oligos mutantes pero en versión corta. Es decir, para el oligo (1) se utilizó un 20mero, para los oligos (2) y (3) 22meros. Se obtuvieron una serie de construcciones, las cuales contenían el fragmento C con las diversas mutaciones generadas: La que contenía las mutaciones producidas por los oligonucleótidos (2 y 3), denominada "MutC", y la que presentó las mutaciones de los oligos (1, 2 y 3), que ya no contenía la mayoría del fragmento B, denominada "MutC-B". Se caracterizaron estas construcciones a nivel de secuencia nucleotídica y patrón de restricción. Se valoró su expresión en las condiciones antes mencionadas. No se observó la aparición de ninguna banda del peso molecular esperado.

#### **Obtención del fragmento C completo.**

El aislamiento inicial del gene del fragmento C a partir de *C. tetani* resultó en un gene incompleto, faltándole la región carboxilo terminal. Se sabe, que para algunas proteínas, puede representar un problema en la síntesis la falta de determinados fragmentos. Por lo anterior decidimos completar el gene del fragmento C al cual le faltaban 280pb de esta región. Esto se hizo por la técnica de reacción de polimerización en cadena (PCR) en la que se emplearon dos oligonucleótidos: uno de ellos era el oligonucleótido (3) que es interno y extiende hacia la parte carboxilo y el otro es un oligo que contiene secuencias homólogas a las señales de terminación del gene y secuencias que crean dos sitios de restricción uno para la enzima BamHI y el otro para la enzima EcoRI; además, este oligo incluye bases adicionales que no hibridizan con la región del gene a amplificar, cuyo objetivo es el de eliminar la posible amplificación de la cadena que no incorpore las secuencias de los sitios de restricción diseñados, (72) (figura 14). EL sustrato para la obtención del segmento carboxilo terminal fue el plásmido pBR327-TetC, obtenido por Joel Osuna, (66). El producto de PCR generado es de 480 pb y contiene dos sitios EcoRI, uno interno al gene y otro aportado por el oligo adicional, los cuales fueron utilizados para la clonación del segmento.

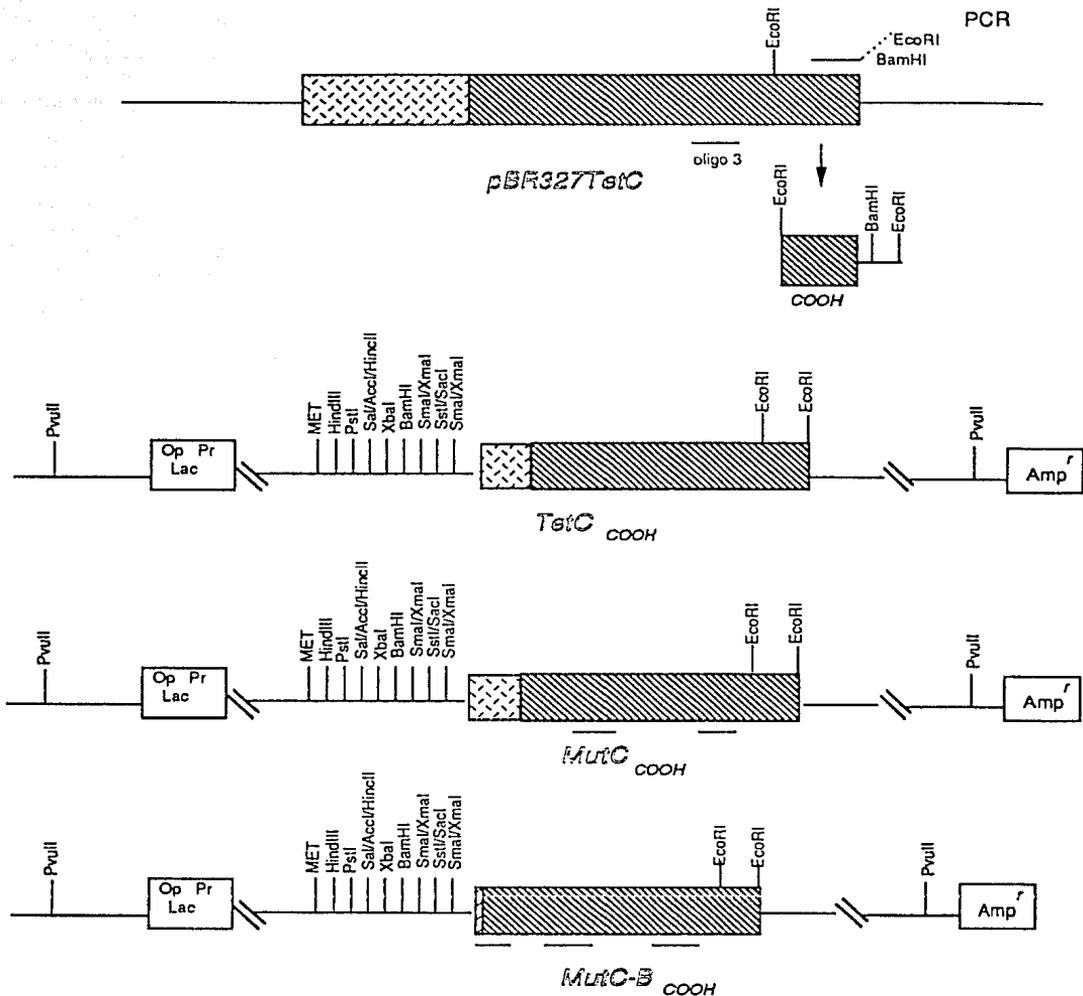


Figura 14.- Obtención de la región carboxilo faltante del fragmento C por medio de la técnica de PCR. Se tomó como templado el pBR327TetC, con el oligo 3 y un oligo con las secuencia terminal del gene se pudo amplificar esta zona. Por medio de una digestión con EcoRI de un sitio interno y uno creado por la secuencia del oligo adicional se clonó en las diferentes construcciones en el sitio de EcoRI (ver figura 12).

A las construcciones TetC, MutC y MutC-B se les adicionó este fragmento denominándolas, respectivamente: "TetC<sub>COOH</sub>", "MutC<sub>COOH</sub>" y "MutC-B<sub>COOH</sub>". Se caracterizaron y valoró su expresión. Dado que otros grupos reportaron la producción del fragmento C en forma insoluble (73), decidimos valorar por separado las proteínas que se recuperan en el precipitado y las que se quedan en el sobrenadante. Se observa que las proteínas generadas de nuestras construcciones, por el fragmento C, se recuperan en forma insoluble, (figura 15).

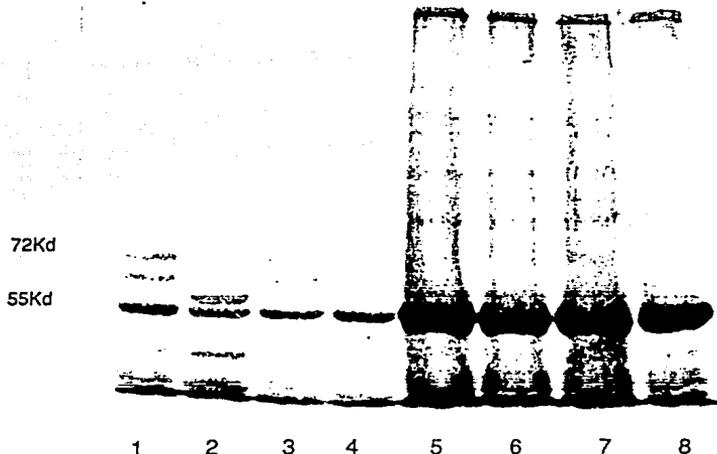


Figura 15. Electroforesis de un gel de SDS poliacrilamida al 7.5%, teñido con azul de Coomasie. Se aplicaron 200ug de proteína obtenida en condiciones de inducción cuantificada por el método de Lowry a cada carril. Proteínas recuperadas en la fase precipitada, 1-4. 1) MutC<sub>COOH</sub>; 2) MutC-B<sub>COOH</sub>; 3) TetC<sub>COOH</sub>; 4) pBSM13<sup>-</sup>. Proteínas del sobrenadante, 5-8. 5) MutC<sub>COOH</sub>; 6) MutC-B<sub>COOH</sub>; 7) TetC<sub>COOH</sub>; 8) pBSM13<sup>-</sup>. Se marcan los pesos moleculares de las proteínas. Las bandas inferiores son productos de proteólisis.

Adicionalmente a la construcción  $TetC_{COOH}$  se le eliminó la región del fragmento B por la creación del sitio  $SacI$ , utilizando el oligo (1), por medio de la técnica de PCR, (como antes se menciona), se le denominó "Tet C- $B_{COOH}$ ". Se caracterizaron estas construcciones a nivel de secuencia y patrón de restricción en la cepa DH5 $\alpha$ , (figura 16).

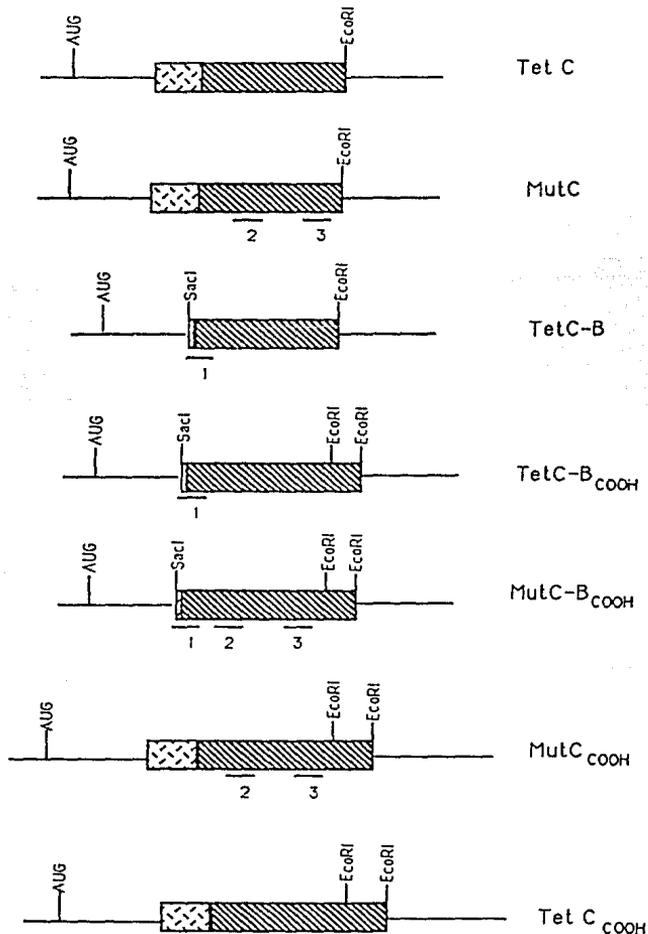


Figura 16. Serie de construcciones obtenidas de diferentes manipulaciones realizadas en el fragmento C.

-  Fragmento B
-  Fragmento C

Para valorar su expresión se transformó a la cepa JM101 por las razones antes mencionadas, tanto en condiciones de inducción como sin inducción, (figura 17). Existe cierta dificultad para la valoración cuantitativa de la expresión de dichas construcciones, debido a la alta concentración de proteínas que se tienen que cargar al gel, la capacidad de resolución de este sistema y la baja expresión de la proteína del fragmento C, hasta ahora solo han podido ser valoradas cualitativamente por medio de una detección inmunológica.

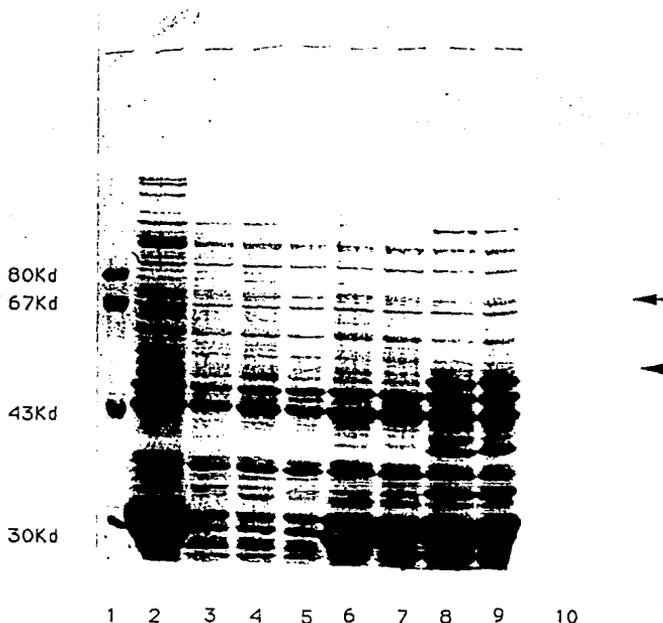


Figura 17. Electroforesis de un gel SDS poliacrilamida al 7.5% con las proteínas obtenidas en la fase precipitada en condiciones de inducción en la cepa JM101. Se aplicaron 200ug de proteína a cada carril cuantificada por el método de Lowry. Teñido con azul de Coomassie. 1) Marcadores de peso molecular; 2) pBSM13<sup>-</sup>; 3) TetC, 63Kd; 4) MutC, 63Kd; 5) TetC-B, 40Kd; 6) TetC<sub>COOH</sub> 72Kd; 7) MutC<sub>COOH</sub> 72Kd; 8) TetC-B<sub>COOH</sub> 55Kd; 9) MutC-B<sub>COOH</sub> 55Kd; 10) Toxoide.

No se observa la aparición de ninguna banda del peso molecular esperado en los carriles 3-5. Sin embargo, se observa la aparición de bandas de los pesos moleculares esperados en los carriles de las construcciones que llevan la región carboxilo del fragmento C, como las señaladas por las flechas. También se observan prominentes bandas de menor peso molecular, principalmente en los carriles: 8) y 9), se considera que son productos de degradación de la misma proteína.

### **Detección Inmunológica.**

Inicialmente se intento valorar la producción de fragmentos de TetC por el método de ELISA, (63) utilizando un anticuerpo monoclonal tipo IgG comercial de la casa "Boehringer", evocado contra el fragmento C. Sin embargo, al no contar con un control positivo adecuado como estandar, no se podía hacer una apreciación cuantitativa de la proteína generada. Posteriormente, se decidió utilizar este mismo anticuerpo para detección en inmunoblot, se encontro que el antígeno adherido a fase sólida no es reconocido por el anticuerpo. Por lo tanto se decidió inmunizar un conejo con toxoide tetánico comercial para generar anticuerpos policlonales que nos permitieran detectar el fragmento C. Las proteínas generadas de las construcciones antes mencionadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por medio de una electrotransferencia. Se realizó una hibridización tipo "Western" de acuerdo al método de Towbin (64), con anticuerpos policlonales de conejo. Estos anticuerpos fueron preabsorbidos con extractos de *E. coli* por diferentes métodos, (ver sección de Métodos). El segundo anticuerpo pertenece al equipo de reactivos de inmunodetección acoplado a fosfatasa alcalina de la casa "Promega". Se detectan bandas que pertenecen al peso molecular esperado y también se observan productos de degradación en algunas construcciones, (figura 18a y 18b).

### **Efecto en la expresión de las diferentes manipulaciones en el fragmento C.**

Se observa que la presencia de mutaciones o la ausencia de la mayoría de la secuencia del fragmento B en el fragmento C, no altera significativamente el nivel de expresión. Cuando es adicionada la parte carboxilo a estas variantes de la proteína se puede apreciar un aumento en la expresión. Esto se puede deber a que la presencia de secuencias terminales las hacen menos susceptibles de ser degradadas proteolíticamente, (74, 75) aunque ahora, por el aumento en la expresión, se hagan más visibles los péptidos de degradación. También se observó que la presencia de secuencias del fragmento B propicia que la proteína sea generada en forma insoluble. Este efecto también se ha observado en construcciones similares reportadas por el grupo de Fairweather et al: (73). Se considera que el fragmento C se estructura como un sólo dominio de acuerdo a lo reportado por Eisel et al. (2) y Makoff et al., (76). Al traer una región adicional (secuencias del fragmento B) a este dominio, en la parte amino terminal puede propiciarse que no se establezcan las interacciones adecuadas en el plegamiento de la proteína, repercutiendo en una proteína insoluble. El efecto de

las mutaciones se ve reflejado en la construcción "MutC-B<sub>COOH</sub>" donde, en comparación a la construcción "TetC-B<sub>COOH</sub>", esta última presenta más péptidos de degradación. Esto puede ser indicación de que, en efecto nuestra hipótesis funciona y que los oligonucleótidos mutantes, principalmente (2 y 3), cambian algunos de los codones que se encuentran en regiones críticas dentro del fragmento C, (69) que pueden afectar la traducción del gene por encontrarse una alta frecuencia de codones poco usuales muy cercanos.

#### **Pruebas biológicas del fragmento C modificado.**

Las pruebas de antigenicidad y protección contra la toxina tetánica del fragmento C modificado y del fragmento silvestre se están realizando en el Instituto Nacional de Higiene. Con el objeto de obtener suficiente muestra biológica, para la realización de las pruebas antes mencionadas, se decidió hacer un cultivo de 10 l. Se obtuvieron 2gr/litro (20 gr de pastilla celular). Se cuantificó la proteína por el método de Lowry y se obtuvo a una concentración de 5mg/ml.

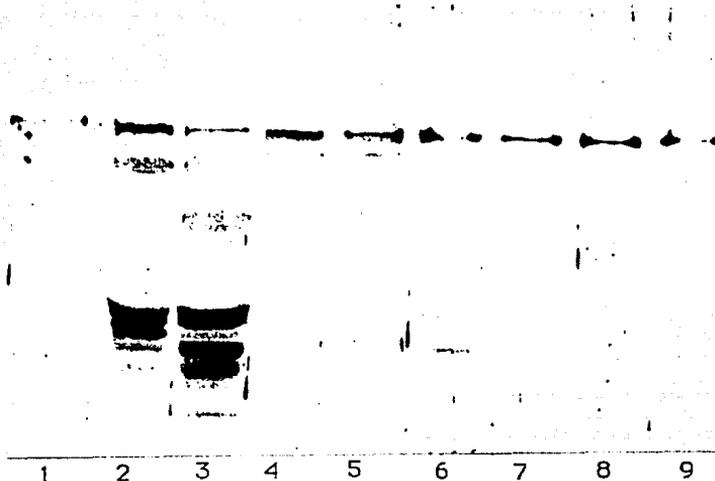


Figura 18b . Hibridización tipo "Western" con anticuerpos policlonales de conejo. Se agregaron 200 ug de proteína recuperadas en la fase precipitada a cada carril. La inmunoelectrotransferencia se llevó a cabo como se mencionó en la sección de métodos. Como control negativo se muestra el vector sin el fragmento C, carril 9). El control positivo es el toxoide.

1) Toxoide; 2) MutC-B<sub>COOH</sub>; 3) TetC-B<sub>COOH</sub>; 4) MutC<sub>COOH</sub>; 5) TetC<sub>COOH</sub>; 6)TetC-B ; 7) MutC; 8) TetC; 9) pBSM13<sup>-</sup>. Se puede observar que en el carril 2) el cual contiene todas las serie de manipulaciones efectuadas al fragmento C presenta una mejor expresión en comparación a las demás construcciones y se producen menos péptidos de degradación en comparación al carril 3) que es la construcción sin las mutaciones del oligo 2 y 3. En los carriles 4) y 5) se ven los mismos péptidos generados sin ninguna alteración en su expresión. En el carril 6) la banda prominente pertenece a péptidos de degradación. En los carriles 7) y 8) Se genera una señal muy débil en la región perteneciente a las proteínas. Las bandas obtenidas pertenecen al peso molecular esperado.

La banda prominente que se observa en todos los carriles pertenece a una reacción inespecífica de los anticuerpos con algún reactivo de la electroforesis. Para este caso el suero de conejo fue preabsorbido con extracto de *E. coli* por el método de precipitación del complejo antígeno anticuerpo. Posteriormente pasado por una columna de sepharosa 4B con extracto de *E. coli* pegado siguiendo las instrucciones de Maniatis et al.

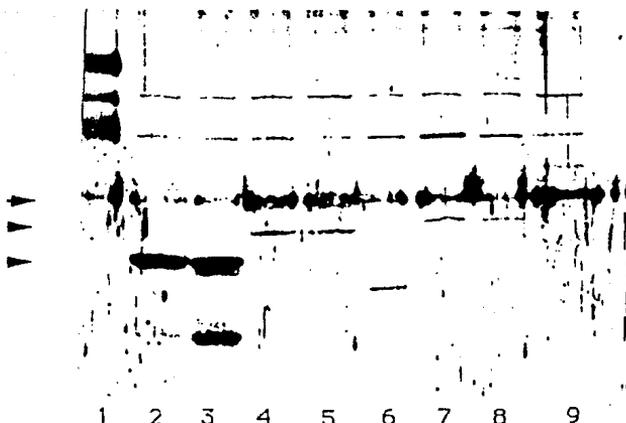


Figura 18a. Hibridización tipo "Western" con anticuerpos policlonales de conejo. Se desarrolló la inmunoelectrotransferencia como se indicó en la sección de métodos. Se agregó como control positivo el toxoide tetánico carril 1). El control negativo es el vector sin el fragmento C, carril 9). Se aplicaron 200ug de proteína obtenida en la fase precipitada, se cuantificó por el método de Lowry. 1) Toxoide; 2) MutC-B<sub>COOH</sub>; 3) TetC-B<sub>COOH</sub>; 4) MutC<sub>COOH</sub>; 5) TetC<sub>COOH</sub>; 6) TetC-B; 7) MutC; 8) TetC; 9) pBSM13<sup>-</sup>. Se puede observar que en el carril 2) el cual contiene todas las serie de manipulaciones efectuadas al fragmento C presenta una mejor expresión en comparación a las demás construcciones y se producen menos péptidos de degradación en comparación al carril 3) que es la construcción sin las mutaciones del oligo 2 y 3. En los carriles 4) y 5) se ven los mismos péptidos generados sin ninguna alteración en su expresión. En el carril 6) la banda prominente pertenece a péptidos de degradación. En los carriles 7) y 8) Se genera una señal muy débil en la región perteneciente a las proteínas. Las bandas señaladas pertenecen a los pesos moleculares esperados para las proteínas generadas por el fragmento C.

La banda prominente que se observa en todos los carriles pertenece a una reacción inespecífica de los anticuerpos con algún reactivo de la electroforesis. Para este caso el suero fue preabsorbido con extracto de *E. coli* por el método de precipitación del complejo antígeno anticuerpo.

### **Construcción de MutC-Bcooh bajo el promotor Tac.**

El nivel de expresión es aún bajo y se pensó que se podría mejorar si el fragmento C modificado, se clonaba bajo un promotor mas fuerte con los señalamientos adecuados de transcripción de tal forma que se expresara como una proteína única. Se decidió clonar el gene MutC-B<sub>cooh</sub> bajo un promotor más fuerte que Lac con el sitio de unión a ribosoma apropiado y un codón de inicio. Esta construcción se realizó utilizando la técnica de PCR. Se diseñaron oligos que tuvieran la secuencia del promotor Tac seguido de una secuencia de sitio de unión a ribosoma con las bases y distancias recomendadas por la literatura y el codón de inicio de traducción del gene, (figura 19). Esta construcción se le llamó pKMutC-B<sub>cooh</sub> ya que es un derivado del plásmido pKK223-3. Se transformó en la cepa JM101, se caracterizó la construcción, y se monitoreo la producción de esta proteína en condiciones de inducción y sin inducción (como se mencionó antes). La proteína esperada es de 50 Kd. Se observa la aparición de una banda perteneciente al peso molecular esperado, que en comparación a las muestras del mismo fragmento pero bajo el promotor de Lac no se aprecia ninguna, (figura 20). Posteriormente se realizó su detección inmunológica (se utilizarón las mismas condiciones antes mencionadas) y se observó que la banda generada por esta construcción pertenece al fragmento C. Se podría decir que cualitativamente se mejoró la expresión del fragmento MutC-Bcooh bajo el promotor Tac en comparación a la expresión obtenida de este bajo el promotor de Lac. Esto puede deberse a que Tac es un promotor más fuerte y aunado a los señalamientos adecuados de traducción y que el fragmento C se expresa como un sólo dominio, favorece su expresión. Esta última estrategia había sido planeada desde un inicio del proyecto sin embargo, el desarrollarla implicaba una serie de técnicas que no se tenían completamente implementadas. Ahora con la ayuda de la técnica de PCR fue mucho más accesible llevarla a cabo.

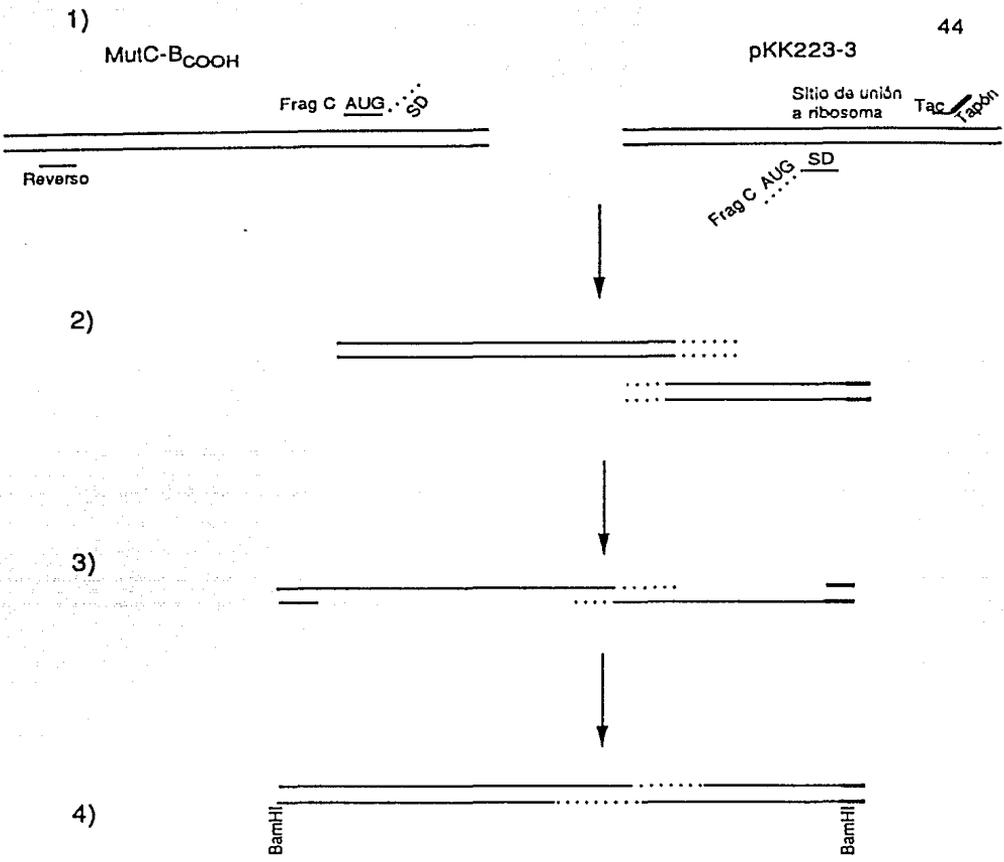


Figura 19. Obtención de la construcción del fragmento MutC-B<sub>COOH</sub> bajo el promotor Tac, sitio de unión a ribosoma óptimo y codón de inicio. 1) Obtención de cada fragmento por medio de PCR. En el caso del fragmento C se utilizó el oligonucleótido primer reverso para extender hacia la región amino de este y un oligo que trae bases homólogas a la región amino del fragmento C y las líneas punteadas indican secuencias del codón AUG y del sitio de unión al ribosoma que se diseñó. En el caso de pKK223-3 se utilizó un oligo que trae bases homólogas al promotor Tac y la línea gruesa indica secuencias no homólogas al plásmido que nos permitirán amplificar sólo las hebras que lleven esta secuencia en los pasos posteriores de amplificación. El otro oligo trae secuencias homólogas al sitio de unión a ribosoma y la línea punteada indica los nucleótidos que se le modificaron a esta región, el codón de inicio y secuencias homólogas al fragmento C. 2) Se purificaron ambas bandas obtenidas por PCR y se obtuvo otra amplificación utilizando estas como template para así obtener la construcción deseada. 3) para amplificarla se utilizaron el oligo reverso y el oligo tapón. 4) Obtenida la banda esperada de 1500pb se digirió con la enzima BamHI que flanquea los extremos de esta y se substituyo por una región similar del plásmido pKK223-3 ya que este tiene secuencias de terminadores de transcripción fuertes.

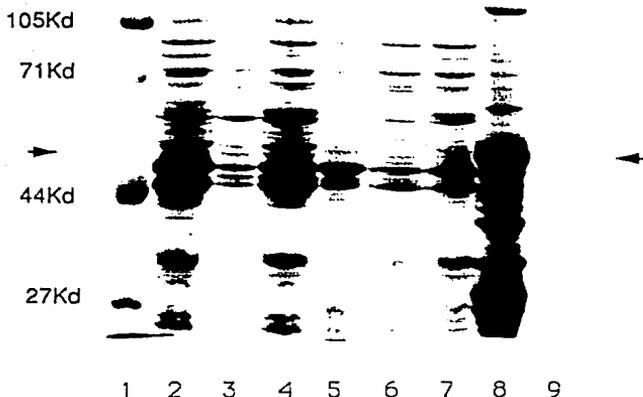


Figura 20. Electroforesis en un gel de SDS poliacrilamida al 7.5% teñido con azul de Coomassie de las proteínas totales obtenidas en la cepa JM101. Se aplicaron 100ug de muestra a cada carril.

1) Marcadores de peso molecular; 2) pKK322-3; 3) pKMutC- $B_{COOH}$ , sin inducción; 4) pKMutC- $B_{COOH}$ , con inducción; 5) pBSM13 con inducción; 6) MutC- $B_{COOH}$ , sin inducción; 7) MutC- $B_{COOH}$ , con inducción; 8) MutC- $B_{COOH}$ , obtenido en la fase precipitada; 9) Toxoide.

La flecha de la izquierda muestra la banda perteneciente al fragmento C bajo el promotor Tac. La flecha de la derecha indica la banda perteneciente al fragmento C modificado. Obtenido por cultivo de 10 L en la fase precipitada.

Se construyó una tabla comparativa en la cual se podría ver el efecto en la expresión con las diferentes manipulaciones realizadas al fragmento C (Tabla 2).

Tabla 2.

Tabla comparativa del efecto de diferentes manipulaciones en el Gene del Fragmento C a nivel de expresión.

| Nombre de la construcción. | Resto del <sup>a</sup> Fragmento B | Carboxilo del <sup>b</sup> Fragmento C | Mutaciones <sup>c</sup> | Nivel de <sup>d</sup> Expresión. |
|----------------------------|------------------------------------|--|-------------------------|----------------------------------|
| Tet C                      | +                                  | -                                      | -                       | Baja                             |
| Tet C-B                    | -                                  | -                                      | -                       | Baja                             |
| Tet C-B <sub>COOH</sub>    | -                                  | +                                      | -                       | Mejor                            |
| Tet C <sub>COOH</sub>      | +                                  | +                                      | -                       | Mejor <sup>1</sup>               |
| Mut C                      | +                                  | -                                      | +                       | Baja                             |
| Mut C-B <sub>COOH</sub>    | -                                  | +                                      | +                       | * Mejor                          |
| Mut C <sub>COOH</sub>      | +                                  | +                                      | +                       | Mejor <sup>1</sup>               |
| pKMutC-B <sub>COOH</sub>   | -                                  | +                                      | +                       | **Mejor                          |

<sup>a</sup> + Contiene el resto del fragmento B.  
- Deletado el resto del fragmento B.

<sup>b</sup> + Clonado el carboxilo del fragmento C.  
- No clonado el carboxilo del Fragmento C.

<sup>c</sup> + Codones mutados.  
- Codones silvestres.

<sup>d</sup> La expresión fue monitoreada en la cepa JM101 en condiciones de inducción como se menciona en (Métodos). El nivel de expresión es evaluado de acuerdo a la señal obtenida en los "Westerns". Se denomina como Baja a una señal poco visible y su reproducibilidad variable; Mejor a la señal fácilmente visible y frecuentemente reproducible; y \*Mejor a la señal notoriamente visible y constantemente reproducible. \*\*Mejor a la señal notoriamente visible tanto en gel teñido con azul de Coomasie como en la inmunodetección.

<sup>1</sup> Presentan el mismo nivel de expresión

## CONCLUSIONES

El uso de codones es un parámetro fundamental a contemplar cuando se espera la expresión de proteínas heterólogas en hospederos como *E. coli* (40, 77) y en el caso del fragmento C se observó que este era una de las principales causas. Sin embargo, aún cambiando los codones de las regiones críticas seleccionadas por nosotros y por otros grupos (69, 76) no hubo el aumento de expresión esperado, y se observó por estos grupos que es necesario un cambio de codones de hasta el 90% para lograr una expresión del 13% de proteína total. La presencia de secuencias del fragmento B propicia un mal plegamiento de la proteína modificada formandola insoluble. La obtención de estas proteínas en forma insoluble, no es un problema para los fines del proyecto.

Se observó una mejora en la expresión al adicionar la parte carboxilo a las variantes del fragmento C. Se podría pensar en un efecto de cooperatividad de la serie de manipulaciones realizadas a este fragmento como se observa en la construcción MutC-B<sub>COOH</sub> en comparación a TetC y el aumento en la expresión cuando el fragmento C modificado es puesto bajo un promotor fuerte con los señalamiento adecuados de traducción. Nuestros resultados, comparados con los de otros grupos de investigación, demuestran algunas de las variables importantes que hay que tener en cuenta en un proyecto de sobreexpresión de proteínas heterólogos. Además de atacar el problema desde el angulo de la eficiencia de transcripción, variables como la eficiencia en el uso de codones y la integridad estructural (expresión de dominios completos) juegan un papel central en la expresión del fragmento C de la toxina tetánica.

Se han reportado una serie de manipulaciones en el fragmento C para tratar de mejorar su expresión en *E. coli*. Sin embargo se ha visto que la mejor alternativa es expresarlo en otro microorganismo. Finalmente la mejor expresión de este fragmento ha sido lograda en un sistema de levadura, en particular en *Pichia pastoris* (78), después de haber intentado muy diversos sistemas y construcciones(68, 69, 76, 79, 80, 81, 82). Eso demuestra la necesidad de un enfoque multidisciplinario y de un cumulo considerable de recursos para generar tecnología competitiva en el área de las vacunas.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bazzini, B. 1979. Tetanus Toxin. Microbial Review. 43;2, 224-240.
- 2.- Eisel, U.; Jarausch, W.; Goretzki, K. Henschen, A.; Engels, J.; Weller, U.; Hudel, M.; Habermann, E.; Niemann, H. 1986. Tetanus Toxin: Primary Structure, Expression in *E. coli*, and Homology with Botulinum Toxins. EMBO J. 5: 2495-2502.
- 3.- Bizzini, B. 1984. Bacterial Vaccines. Tetanus Toxin. Academic Press, Inc. U.S.A. 431.
- 4.- Stephen, J., Pietrowsky, R.A. 1986. Toxins wich Traverse Cell Membranes and Deregulate Cells. In: Bacterial Toxins. 55-63.
- 5.- Boquet, P. & Duflo, E. 1984. Fragment B of Tetanus toxin Forms Channels in Lipid Vesicles at Low pH. In: Bacterial Protein Toxins. Alouf, J., Fehrenbach, F., Freer, J., Jeliaszewicz, J. Ed. 4421-4426.
- 6.- Penner, R., Neher, E. & Dreyer, F. 1986. Intracellularly Injected Tetanus Toxin Inhibits Exocytosis in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. Nature 324; 76-78.
- 7.- Montecucco, C. 1986. How do Tetanus and Botulinim Toxins Bind to Neuronal Membranes?. TIBS 11; 314-317.
- 8.- Ahnert-Hilger, G. Weller, U., Dauenroth, M. Habermann, E. & Gratzl, M. 1989. The Tetanus Toxin Light Chain Inhibits Exocytosis. FEBS 242; 245-248.
- 9.- Kenimer, J.G., Habig, W.H.; Hardegree, M.C. 1983. Monoclonal Antibodies as Probes of Tetanus Toxin Structure and Function. Infect. Inmun. 42: 942-948.
- 10.- Ratafia, M. 1987. Worldwide Opportunities in Genetically Engineered Vaccines. Biotechnology 5: 1154-1158.
- 11.- Garnier, J. & Roban, B. 1986. Introduction to Proteins on Protein Engineering. Ed. Elsevier. Holanda, pag. 691.
- 12.- Bialy H. 1987. Recombinant Proteins: Virtual. Bio/Technology 5;9 883-890.
- 13.- Shutter. Gene. 1987.
- 14.- Bogosian, G. & Kane, J. 1991. Recombinant DNA Technology and Applications. Optimizing Protein Production in Recombinant Strains of *E. coli*. Mac Graw-Hill, Inc. 285.
- 15.- Hsiung, H., Mayne, N. & Becker, G. 1986. High-Level Expression, Efficient Secreton and Folding of Human Growth Hormone in *E. coli*. Bio/Technology 4;991-995.
- 16.- Greenfield L., Dovey H., Lawyer F. & Gelfand D. 1986. Bio/Technology 4;1006-1011.

- 17.- Zhong-Ru G. & et al. 1989. High-Level Expression in *E. coli* of a Chemically synthesized gene for [Leu-28]echistatin. *Gene*, 79; 159-166.
- 18.- Lee N. et al. 1987. Modification of mRNA Structure and Alteration of the expression of Human Interferon  $\alpha$  1 in *E. coli*. *Gene*, 58;77-86.
- 19.- Hulsmann K., Quaas R., Georgalis Y., Saenger W., Hahn U. 1991. High-Level Expression of a Semisynthetic dam Gene in *E. coli*. *Gene*, 98;83-88.
- 20.- Ivanoff L., Towatari T., Ray J., Korant B., Petteway S. 1986. Expression and Site-Specific Mutagenesis of the Poliovirus 3C Protease in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83; 5392-5396.
- 21.- Zurawski S., Pope K., Cherwinski H. & Zurawski G. 1986. Expression in *E. coli* of Synthetic Human Interleukin-1 $\alpha$  Genes Encoding the Processed Active Protein, Mutant Protein, and  $\beta$ -Galactosidase Fusion Proteins. *Gene*. 49; 61-68.
- 22.- Makoff et al. 1989. Translational Fusion with Fragments of the trpE Gene Improve the Expression of a Poorly Expressed Heterologous Gene in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 135; 11-24.
- 23.- Schoner E., Belagaje R. & Schoner R. 1991. Gene Expression Technology. Enhanced translational Efficiency with Two-Cistron Expression System. *Methods In Enzymology*, 185;94.
- 24.- Schoner E., Hsiung H., Belagaje R. & Schoner R. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81; 5403-5407.
- 25.- Robinson M., Lilley R., Little S., Emtage J., Yarranton G., Millican A., Eaton M. & Humphreys G. 1984. Codon Usage can Affect Efficiency of Translation of Genes in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 12; 6663-6671.
- 26.- Reddy P., Peterkofsky A. & McKenney. 1985. Translational Efficiency of the *E. coli* Adenilate Cyclase Gene: Mutating the UUG Initiation Codon to GUG or AUG Results Increased Gene Expression. *Proc. Natl. Sci. USA*. 82; 5656-5660.
- 27.- Thomas I., Dix D. & Thompson R. 1988. Codon Choice and Gene Expression: Synonymous Codons Differ in Their Ability to Direct Aminoacylated-Transfer RNA Binding to Ribosomes *in vitro*. *Proc. Natl. Sci. USA*. 85; 4242-4246.
- 28.- Bonekamp F., Dalboge H., Christensen T. & Jensen K. 1989. Translation Rates of Individual Codons Are Not Correlated with tRNA Abundance or with Frequencies of Utilization in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 171;11, 5812-5816.
- 29.- Varenne S., Buc J., Lloubes R. & Lazdunski C. 1984. Translation in a Non-Uniform Process. *J. Mol. Biol.* 180; 549-576.
- 30.- Gouy M & Gautier C. 1982. Codon Usage in Bacteria: Correlation with Gene Expressivity. *Nucleic Acids Research*. 10;22, 7055-7075.

- 31.- Sharp P., Cowe E., Higgins D., Shields D., Wolfe K. & Wright F. 1988. Codon Usage Patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Research*, 16;17, 8207-8211.
- 32.- Grosjean H. & Fiers W. 1982. Preferential Codon Usage in Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy and the Selective Codon Usage in Efficiently Expressed Genes. *Gene*. 18: 199-209.
- 33.- Mita K., Ichimura S. & Zama M. 1988. Specific Codon Usage Pattern and its Implications on the Secondary Structure of Silk Fibroin mRNA. *J. Mol. Biol.*, 203; 917-925.
- 34.- Bibb M., Findlay P. & Johnson M. 1984. The Relationship Between Base Composition and Codon Usage in Bacterial Genes and its Use for the Simple and Reliable Identification of Protein-Coding Sequences. *Gene*, 30; 157-166.
- 35.- Gutman G. & Hatfield G. 1989. Nonrandom Utilization of Codon Pairs in *E. coli*. *Proc. Natl. Sci. USA*. 86; 3699-3703.
- 36.- Ohno S. 1988. Codon Preference is but an Illusion Created by the Construction Principle of Coding sequences. *Proc. Natl. Sci. USA*. 85; 4378-4382.
- 37.- Varenne S., Baty D., Verheij H., Shire D & Ladunski C. 1989. The Maximum Rate Expression is Dependent on the Downstream Context of Unfavourable Codons. *Biochemie*, 71;1221-1229.
- 38.- Varenne S. & Lazdunski C. 1986. Effect distribution of Unfavourable Codons on the Maximum Rate of Gene Expression by an Heterologous Organism. *J. Theor. Biol.* 120: 99-110.
- 39.- Bulmer M. 1990. The Effect of Context on Synonymous Codon Usage in Genes with Low Codon Usage Bias. *Nucl. Acids Res.* 18:2869-2873.
- 40.- Cantrell A., Burgett S., Cook J., Smith M. & Hsiung M. 1991. Effect of Second-Codon Mutations of the Insulin-like Growth Factor-II-Encoding Gene in *Escherichia coli*. *Gene*. 98: 217-223.
- 41.- Chen G. & Inouye M. 1990. Suppression of the Negative Effect of minor Arginine Codons on Gene Expression; preferential Usage of Minor Codons within the First 25 Codons of the *E. coli* Genes. *Nucleic Acids Research*, 18;6 1465-1473.
- 42.- Seetharam R., Heeren A., Wong E., Bradford S., Klein B., Aykent S., Kotts C., Mathis K., Bishop B. Jennings M., Smith C., & Siegel N. 1988. Mistranslation in IGF-I During Over-Expression of the Protein in *Escherichia coli* Using a Synthetic Gene Containing Low Frequency Codons. *Bioche. and Biophys. Com.* 155: 518-523.
- 43.- Springer B. & Sligar S. 1987. High-Level Expression of Sperm Whale Myoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:8961-8965.
- 44.- Williams D., Regier D., Akiyoshi D., Genbauffe F. & Murphy J. 1988. *Nucl. Acids Res.* 16:10453-10467.

- 45.- Morinaga Y., Franceschini T., Inouye S. & Inouye M. 1984. Improvement of Oligonucleotide-Directed Site-Specific Mutagenesis Using Double-Stranded Plasmid DNA. *Bio/Technology* 636-639.
- 46.- Zoller M. & Smith M. 1984. Oligonucleotide-Directed Mutagenesis: A Simple Method Using Two Oligonucleotide Primer and a Single-Stranded DNA Template. *DNA*, 3;6 479-488.
- 47.- Su T. & Gewely R. 1988. A Multisite-directed Mutagenesis Using T7 DNA Polymerase: Application for Reconstructing a Mammalian Gene. *Gene*, 69; 81-89.
- 48.- Terwilliger T. 1988. Simple and Highly Efficient Site-Specific Mutagenesis, by Ligation of an Oligodeoxiribonucleotide into Gapped Heteroduplex DNA in Which the Template Strand Contain Deoxyuridine. *Gene*, 69; 317-324.
- 49.- Velati A., de Ferra F. & Grandi G. 1988. A Rapid and Versatile site-directed method of Mutagenesis for Double-Stranded Plasmid DNA. *Gene*, 69; 325-330.
- 50.- Steffan, N. Ho. Hunt, H.D.; Horton, R.M.; Pullen, J.K. & Pease, L.R. 1989. Site-directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction. *Gene*. 77: 51-59.
- 51.- Hedstrom L. 1991. Modulation of Enzyme Specificity by Site-Directed Mutagenesis. Academic Press. *Meth. Enz.* 202.
- 52.- Veronnesi . 1981. *Tatanus Important New Concepts*. Excerpto Medica. NY. 8-27.
- 53.- Maniatis, T.; Fritsch, E. & Sambrook, J. 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, N.Y.
- 54.- Rodriguez, R. L. & Tait, R. C. 1983. *Recombinant DNA Techniques. An Introduction*.
- 55.- Chung C., Niemela S. & Miller R. 1989. One-Step Preparation of Competent *E. coli*. Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution. *proc. Natl. Sci. USA*. 86; 2172-2175.
- 56.- Dower W., Miller J. & Ragsdale C. 1988. High Efficiency Transformation of *E. coli* by High Voltage Electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16;13, 6127-6145.
- 57.- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 5463-5467.
- 58.- Taylor, J.W; Schmidt, W. & Eckstein, F. 1988. *Nucl. Acids Res.* 16: 791-802.
- 59.- Nakamaye K. & Eckstein F. 1986. *Nucleic Acids Research*, 14:9679.
- 60.- Zoller, J.M. & Smith, M. 1983. Oligonucleotide-Directed Mutagenesis of DNA Fragments Cloned into M13 Vectors. *Methods in Enzymology* 100: 501.
- 61.- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

- 62.- Peterson, G. 1979. Review of the Folin Phenol Protein Quantation Method of Lowry Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100: 201-220.
- 63.- Harlow et al. 1988. *Antibodies*. Cold Spring Harbor Lab. NY.
- 64.- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. 1979. Electroforetic Transfer of Proteins from Polyacrylamide gel to Nitrocellulose Sheets: Procedures and some Applications. *Proc. Natl. Sci. USA.* 76; 4350-4354.
- 65.- Bers G. & Garfin D. 1985. Protein and Nucleic Acid Blotting and Immunobiochemical Detection. *Biotechniques.* 3: 276-288.
- 66.- Osuna J. 1989. Aislamiento de un fragmento inmunogénico de Toxina Tetánica. UNAM.
- 67.- Fairweather, N.F. Lyness, V.A., Pickard, D.J., Allen, G. & Thomson, R.O. 1986. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Expression of Tetanus Toxin Fragment C en *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165: 21-27.
- 68.- Halpern J., Habig W., Neale E. & Stibitz S. 1990. Cloning and Expression of Functional Fragment C of Tetanus Toxin. *Infection and Immunity*, 58;4, 1004-1009.
- 69.- Makoff A., Oxer M., Romanos M., Fairweather N. & Ballantine S. 1989. Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *E. coli*: High Level Expression by Removing Rare Codons. *Nucl. Acids Res.* 17: 10191-10202.
- 70.- Wang, L.M. Geihl, D.K. Ghosh Choudhury, A. Minter, L. Martinez, D.K. Weber & Sakaguchi A.Y. 1989. Site-Directed Deletion Mutagenesis Using Phagemid Vectors and Genetic Selection. *BioTechniques.* 7: 1000-1010.
- 71.- Berent S., Mahmoudi M., Torezynski R. Bragg P., Bollon A. 1985. Comparison of Oligonucleotide and Long DNA Fragments as Probes in DNA and RNA Dot, Southern, Northern, Colony and Plaque Hybridizations. *Biotechniques.* 3: 208-220.
- 72.- Merino E., Osuna J., Bolívar F. & Soberón X. 1992. A General, PCR-Based Method for Single or Combinatorial Oligonucleotide-Directed Mutagenesis on pUC/M13 Vectors. *BioTechniques*, 12;4, 508-510.
- 73.- Fairweather, N.F. Lyness, V.A. & Maskell, D.J. 1987. Immunization of Mice Against Tetanus with Fragments of Tetanus Toxin Synthesized in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55: 2541-2545.
- 74.- Bowie J. & Sauer R. 1989. Identification of C-Terminal Extensions That Protect Proteins from Intracellular Proteolysis. *The Journal Biological Chemistry*, 264;13, 7596-7602.
- 75.- Parsell D. & Sauer R. 1989. The Structural Stability of a Protein Is an Important Determinant of Its Proteolytic Susceptibility in *Escherichia coli*. *The Journal Biological Chemistry*, 264;13, 7590-7595.

- 76.- Makoff A., Ballantine J., Smallwood S. & Fairweather N. 1989. Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: its purification and potential use as a vaccine. *Biotechnology*, 7: 1043-1046.
- 77.- De Boer H. & Kastelein R. Maximizing Gene Expression. Biased Codon Usage: An Exploration of its Role in Optimization of Translation. Butterworths. USA. 225-285.
- 78.- Clare J., Rayment F., Ballantine S., Sreekrishna K. & Romanos M. 1991. High-Level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Biotechnology*, 9: 455-460.
- 79.- Gillies S., Dorai H., Wesolowski J., Majeau G., Young D., Boyd J., Gardner J. & James K. 1989. Expression of Human Anti-Tetanus Toxoid Antibody in Transfected Murine Myeloma Cells. *Bio/Technology*, 7; 799-804.
- 80.- Romanos A., Makoff A., Fairweather F., Beesley N., Slater E., Rayment B. Payne M. & Clare J. 1991. Expression Tetanus Toxin Fragment C in Yeast: Gene Synthesis is Required to Eliminate Fortuitous Polyadenylation Sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Research*, 19;7, 1461-1467.
- 81.- Ian C., Rodgers B., Makoff A., Chatfield S., Slater D. & Fairweather N. 1991. Synthesis of Tetanus Toxin Fragment C in Insect Cells by Use of a Baculovirus Expression System. *Infection and Immunity*, 59;5, 1627-1632.
- 82.- Fairweather F., Chatfield N., Makoff J., Strugnell A., Bester J. 1990. Oral Vaccination of Mice Against Tetanus by Use a Live Attenuated *Salmonella* Carrier. *Infect. Immun.* 58: 1323-1326.