

79
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA
DE DOS EPITOPOS DE LA PORINA
*Omp C DE Salmonella typhi***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA
B I O L O G A
P R E S E N T A :

MARTA CONCEPCION LOPEZ-SANTIBAREZ GUEVARA



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.- Las Porinas	9
A) Estructura de las porinas El monómero El trímero	
B) Expresión y función de las porinas	
2.- Inmunogenicidad de las porinas de <i>S. typhi</i>	13
3.- Predicción de epitopos	15
II. ANTECEDENTES: Identificación de epitopos de <i>Omp C</i>	18
III. OBJETIVOS	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1.- Región 246-254	24
A) Cultivo de la bacteria	
B) Análisis de restricción	
C) Purificación de la PAP-CTB y la CTB nativa	
D) Electroforesis de proteínas	
E) Titulación de la CTB	
F) Identificación del péptido	
2.- Región 285-303	28
A) Síntesis	
B) Conjugación a proteínas acarreadoras	
C) Esquema de inmunización	
D) Evaluación inmunoquímica de los sueros de ratón a.- Titulación de los sueros b.- Ensayo con la proteína nativa c.- Ensayo de competencia	
V. RESULTADOS	32
1.- Proteína de fusión PAP-CTB	32
A) Análisis de restricción de la construcción genética	
B) Electroforesis de la CTB y la PAP-CTB en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras	
C) Titulación de CTB en los sobrenadantes de cultivo	
D) Identificación del péptido 246-254 en la proteína híbrida con el suero anti-porinas	
2.- Péptido 285-303	33
A) Conjugados	
B) Titulación de anticuerpos anti-conjugado	

- C) Reactividad de los anticuerpos anti-péptido con la porina
Omp C nativa
- D) Ensayo de competencia

VI. DISCUSIÓN	41
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	48
VIII. BIBLIOGRAFÍA	50

ABREVIATURAS

Å	Angstroms (10 ⁻¹ nanómetros (nm))
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine serum albumin)
C3H/FeJ	Cepa singénica de ratón
Da, kDa	Daltons, kilodaltons
CTB	Subunidad B de la toxina del cólera (Cholera toxin B subunit)
DH5α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> no transformada
DL ₅₀	Dosis letal media
EDC	Hidrocloruro de 1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (Enzyme linked immunosorbent assay)
GM ₁	Monosialogangliósido-GM ₁
GM ₁ -ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida empleando GM ₁ como antígeno
KLH	Hemocianina (Keyhole limpet hemocyanin)
M _r	Masa relativa
NIH	Cepa abierta de ratón
OmpC, rOmpC	Porina codificada por el gen <i>omp C</i> , Porina recombinante codificada por pST13
OPD	o-fenilendiamina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (Poliacrilamide-Gel Electrophoresis)
PAP, PAP-CTB	Péptido antigénico de la porina, proteína de fusión entre PAP y CTB
pb, kb	pares de bases de nucleótidos, kilobases (10 ³ pares de bases)
PME	Proteína de membrana externa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio

VII. RESUMEN

Con base en las predicciones teóricas de los epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, se eligieron dos regiones para analizar su antigenicidad: a) la región contenida entre los aminoácidos 246 a 255, la cual se tiene expresada en una proteína de fusión con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB); y b) el segmento comprendido entre los aminoácidos 285 a 303, disponible como péptido sintético.

Se confirmó la construcción genética (péptido 246-254--CTB), mediante un análisis de restricción del DNA, donde se observó el patrón electroforético esperado. Se produjo la proteína híbrida (denominada PAP-CTB) a partir de las cepas recombinantes *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pJAK y pJSS, caracterizándola en electroforesis (SDS-PAGE); y se observó, por GM,-ELISA, que la proteína de fusión permanece como una proteína funcional en términos de la CTB. Se incubó la PAP-CTB con anticuerpos anti-porinas y se verificó su reconocimiento; con lo cual se confirmó el papel del péptido 246-255 de Omp C como epitopo para células B y la factibilidad de expresarlo en la proteína de fusión, adoptando una conformación que podría ser semejante a la que presenta en la proteína nativa.

Se conjugó el péptido sintético 285-303 a tres diferentes proteínas acarreadoras (hemocianina, albúmina sérica bovina y lisozima) con el fin de emplear los conjugados de manera alternada en un esquema de inmunización de ratones de la cepa C3H/FeJ. Los anticuerpos anti-péptido se titularon con el conjugado y, mediante un ensayo de inhibición con el péptido libre, se comprobó su especificidad por el péptido. Se incubaron los sueros con la porina completa, y se observó la capacidad de los anticuerpos anti-péptido para reconocer a la porina en su forma nativa. Con estos resultados se demostró que el péptido 285-303 constituye un epitopo expuesto de la porina Omp C de *Salmonella typhi*.

I. INTRODUCCIÓN

1.- Las Porinas.

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas funciona como un filtro molecular para compuestos hidrofílicos y protege a la célula de algunos mecanismos de defensa del organismo hospedero. Uno de los principales componentes activos de la membrana externa con estas propiedades, son las porinas. Estas proteínas, con pesos moleculares de 36,000-38,000 Da, se ensamblan como trímeros y forman poros o canales que permiten la difusión inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas al interior de la bacteria.¹

Las porinas identificadas tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium* son Omp C, Omp F y Pho E; mientras que Omp D al parecer es exclusiva de *S. typhimurium*. Estas proteínas son muy semejantes entre sí y tan solo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos. Las estructuras de las porinas presentan una gran estabilidad en presencia de detergentes como las sales biliares y el SDS, y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas.¹

A) Estructura de las porinas.-

El monómero.

Dentro de la familia de porinas de los géneros *Escherichia* y *Salmonella*, las más estudiadas son OmpF y PhoE de *E. coli*, pero debido a su gran homología (más del 60%), se considera que la estructura de las otras porinas es muy similar. Están formadas por tres monómeros idénticos de forma cilíndrica semejante a un barril (fig. 1). La entrada del poro se

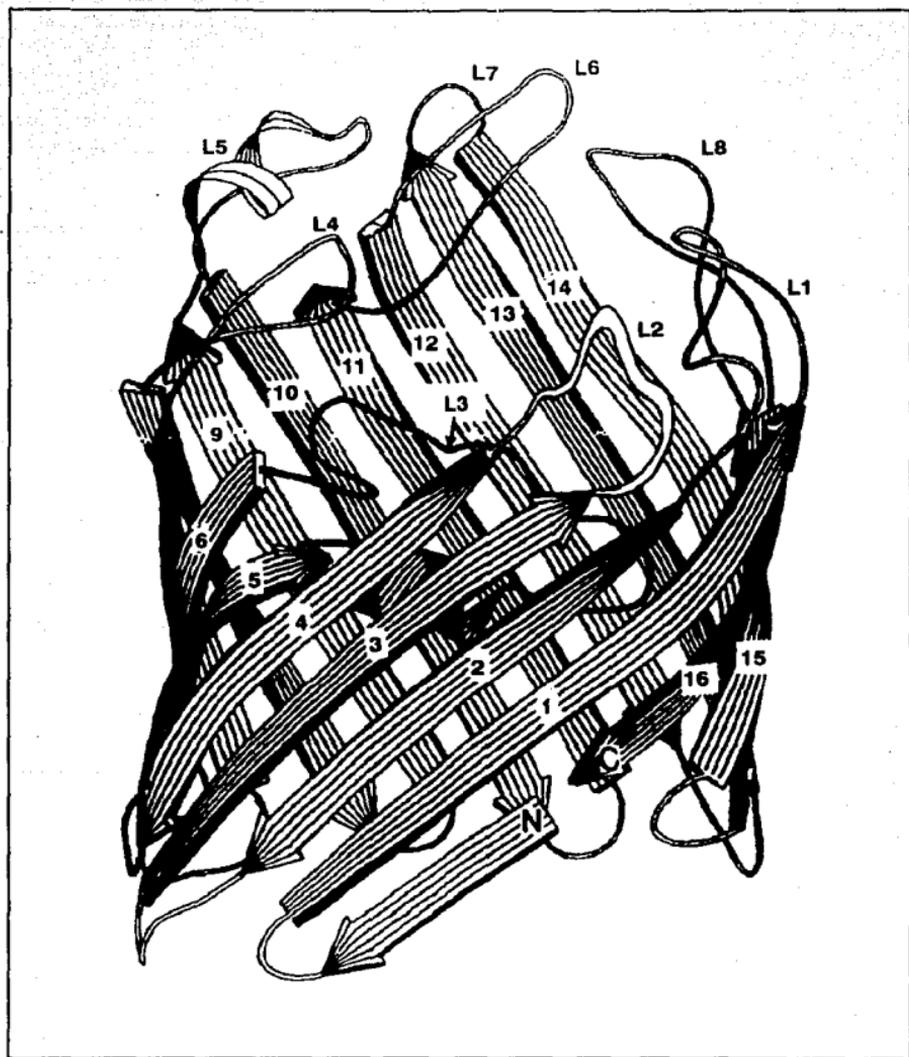


Fig. 1 Estructura tridimensional del monómero de la porina Omp F de *E. coli*

encuentra delimitada por largas prolongaciones del cilindro que restringen su acceso al inclinarse hacia el centro del canal. A la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior. Esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones hasta el otro extremo, el cual desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria.²

El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio. Los estudios cristalográficos más recientes² realizados en OmpF y PhoE, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril β formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras β de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1.²

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal. La entrada del poro está restringida por las asas largas y dispares que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 Å a 19 Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15 x 22 Å, y está definida por las vueltas β . El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas, y por tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de entrada de los poros.²

El trímero

Los monómeros de las porinas se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa y formar trímeros.³ Contrariamente a lo que antes se creía, los canales no se fusionan entre sí; sino que permanecen separados a lo largo del trímero por una distancia de $\approx 35 \text{ \AA}$.²

La principal contribución a la formación del trímero es el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas β 1-5 y β 16, donde los diez residuos carboxilo de la región β 16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y la estabilidad de la porina ^{4,5}.

B) Expresión y función de las porinas.-

Las porinas se encuentran en la superficie de la bacteria en cantidad relativamente elevada, (hasta 10^5 copias por célula), por lo que constituyen una de las proteínas más abundantes en la bacteria en términos de masa; pueden representar hasta un 2% de la proteína total de la célula ¹. Hasta el momento las porinas más estudiadas son las de *E. coli* y *S. typhimurium*, y sus principales características se muestran en la tabla 1.

Las condiciones de crecimiento, como la actividad osmótica y la temperatura, regulan la expresión de las porinas. En un medio de cultivo común (que contenga fuentes de C y N, factores de crecimiento y sales minerales) solo OmpF, OmpC y OmpD se producen; PhoE únicamente se expresa bajo condiciones de escasez de fosfatos. La expresión de OmpF se reprime por la temperatura y la osmolaridad elevadas; por lo que algunas cepas prácticamente

no sintetizan esta proteína a 37 °C y en presencia de aproximadamente 0.9% de NaCl. Por el contrario, la expresión de OmpC, se ve favorecida con niveles elevados de sales¹.

**Tabla 1. Características de las porinas de
a) *Escherichia coli* y b) *Salmonella typhimurium* ^{1,2}**

PORINA	RECEPTOR A FAGOS O COLICINAS	PESO MOLECULAR (kDa)	DIAMETRO aproximado (nm)	REGULACION DE LA SINTESIS
Omp F	a) Tuf a, T2, TP1, TP2,	32.7	1.2	Reprimida por alta osmolaridad
	b) TP5, CoIA	39.3	1.2	
OmpC	a) Tuf b, Mol, PA2, 434, SS1, TP2, TP5, TP6	36.0	1.1	Desreprimida por alta osmolaridad
	b) PH42, PH105, PH221	39.8	1.3	
OmpD	a) No tiene	No tiene	No tiene	Dependiente de AMPc
	b) PH31, PH42, PH51	38.0	1.3	
PhoE	a) TC23, TC45	36.8	1.2	Desreprimida por escasez de P _i
	b) No identificado	36.0	1.2	

OmpC y OmpF son proteínas muy semejantes funcional y estructuralmente; sus poros tienen tamaños de exclusión similares ($M_r \approx 600$ da), y diámetros que varían entre 1.1 y 1.3 nm³. Se cree que estas dos proteínas y la porina Pho E evolucionaron de una proteína ancestral común, ya que las secuencias proteicas contienen un 63% de aminoácidos idénticos y que esta homología se incrementa hasta en un 86% en el extremo carboxilo de ambas proteínas.* Al realizar estudios *in vitro* en los que se reconstituyen las porinas en membranas lipídicas, se ha demostrado que las porinas de *E. coli* son permeables a trisacáridos y tetrapéptidos; lo cual

implica que permiten el paso de nutrientes y iones a través de la membrana externa de la bacteria. Además, la medición de la conductancia (G) en estas membranas, ha permitido calcular el diámetro de los poros.³

No hay información que muestre la especificidad del poro hacia los solutos; sino que aparentemente son las propiedades fisicoquímicas de los solutos las que determinan su velocidad de difusión a través de la porina; siendo tres las principales: a) el tamaño, (b) la carga eléctrica y (c) la hidrofobicidad del soluto.⁴

2.- Inmunogenicidad de las porinas de *S. typhi*.

Las porinas de *S. typhi* desempeñan un importante papel en la inducción de una respuesta inmune contra la fiebre tifoidea.⁶

Se ha demostrado que estas proteínas estimulan mecanismos efectores humorales y celulares en modelos murinos y que son buenos inmunógenos para la inducción de un estado de protección contra la infección por la bacteria.^{7,8,9,10,11,12,13}

Se comprobó que un suero anti-proteínas de membrana externa (PMEs) de *S. typhi*, empleado para inducir la protección pasiva en ratones, reconoció con mayor intensidad a las porinas de las diferentes cepas de *Salmonella* utilizadas en un ensayo de inmunoelectrotransferencia. Este hecho mostró que las porinas podían ser los antígenos responsables de la inducción de protección.⁷

Más adelante la inmunización con cantidades tan pequeñas como 10 μg de porinas purificadas de *Salmonella typhi*, confirió protección al 90% de los ratones NIH retados con 500 DL_{50} de la misma bacteria. En cambio no se indujo protección al reto con *Salmonella typhimurium* en las mismas condiciones, lo cual demuestra una respuesta especie-específica a las porinas.*

El empleo de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas de *S. typhi* 9,12,VI:d confirió una protección del 60% al reto con 20 DL_{50} en el modelo murino* mientras que los anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido no indujeron protección.¹⁰

Las porinas de *S. typhi* son también inmunogénicas en el humano. Esto se demostró cuando, al evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes con fiebre tifoidea en fase convaleciente, se encontraron anticuerpos de clase IgG dirigidos contra las porinas.¹¹ De igual modo, la administración de la vacuna antitifoidea oral indujo la producción de anticuerpos anti-porinas en las personas estudiadas.¹²

Se demostró que las porinas de *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* son capaces de inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos de ratones NIH inmunizados con PME de *S. typhi*; y más aun, que la respuesta a las porinas de *S. typhi* no se debió a la presencia de LPS.¹³

Estos hallazgos en torno a las porinas de *S. typhi* y su papel en la respuesta inmune, han motivado un estudio más profundo sobre su antigenicidad; es decir, sobre las regiones de la proteína responsables de la inducción de protección.

3.- Predicción de epitopos

Los determinantes antigénicos de una proteína, o epitopos, son aquellas regiones contra las cuales está dirigida la respuesta inmune. A partir del estudio y comparación de un gran número de regiones identificadas en diversas proteínas, se ha podido establecer que:

1.- Los epitopos reconocidos por linfocitos T están contenidos en una pequeña región de la proteína, y

2.- Los epitopos reconocidos por linfocitos B consisten en aminoácidos que pueden o no ser contiguos en la secuencia, pero que se encuentran unidos en la superficie de la proteína debido al plegamiento de la cadena polipeptídica.¹⁴

Se ha empleado una variedad de técnicas para la búsqueda de estos sitios antigénicos dentro de las proteínas. Entre ellas las más utilizadas han sido la fragmentación química o enzimática de la proteína, la clonación de fragmentos genéticos, y la elaboración de péptidos sintéticos. Recientemente, con la introducción de los métodos que permiten la síntesis simultánea de muchas secuencias cortas, los péptidos sintéticos se han empleado como el medio primario para la identificación de los epitopos.¹⁴

Una estrategia para el mapeo de los epitopos puede ser la de sintetizar varios péptidos con secuencias traslapadas que en total abarquen la secuencia completa de la proteína. Sin embargo, esto resulta demasiado costoso y laborioso; por lo que otra alternativa es la síntesis de péptidos seleccionados mediante una predicción de epitopos.

En la actualidad se cuenta con diversos métodos computacionales elaborados a partir de estudios y modelos matemáticos, los cuales permiten establecer predicciones de las regiones de la proteína que puedan ser antigénicas.

Con base en el análisis de algunos péptidos inmunodominantes reconocidos por las células T, Margalit y Berzofsky^{16,17,18} desarrollaron un algoritmo de predicción que se basa en el modelo de la hélice anfipática. Este considera que los sitios antigénicos son hélices con una cara predominantemente polar, mientras que la cara opuesta es principalmente no polar. Se postula que la porción hidrofóbica del péptido se asocia a la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC); mientras que la región hidrofílica se une al receptor del linfocito T.¹⁹ Se elaboró entonces el programa **AMPHI**, del paquete **PCGENE**²⁰, basado en este algoritmo de predicción; sin embargo, solo funciona para los epitopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores, al ser presentados en el contexto de las moléculas del MHC de clase II.²¹

Más adelante Rothbard²² reportó secuencias halladas con alta significancia estadística en determinantes antigénicos reconocidos por células T, tanto cooperadoras como citotóxicas. A estas secuencias se les denomina "patrones de Rothbard", y es necesario buscarlas manualmente. Actualmente, Rammensee^{23,24,25} ha demostrado la presencia de patrones (denominados "motifs") en la secuencia reconocida por la molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad del ratón. Ello permite una predicción más aproximada de los péptidos que serán reconocidos por las células T.

Se ha descrito, por otro lado, que entre las características importantes de los epitopos para inducir la respuesta inmune de las células B, se encuentran las de ser las secuencias más

expuestas en la superficie de la proteína, y así mismo ser altamente hidrofílicas, cargadas y flexibles. Para establecer las predicciones de epitopos reconocibles por células B se tienen varios programas para computadora. El programa **ANTIGEN**²⁶ asigna un valor de hidrofiliidad a cada aminoácido de la proteína, de acuerdo a la escala de Levitt,²⁶ y tomando fragmentos de seis aminoácidos, promedia sus valores. Así analiza regiones superpuestas a lo largo de toda la secuencia y selecciona la región más hidrofílica como un probable determinante antigénico.

Otro programa del mismo paquete, **FLEXPRO**,²⁸ basa sus predicciones en el modelo de flexibilidad o movilidad de los antígenos, estudiado por Karpluz y Schulz. Con base en estudios de resonancia magnética nuclear y análisis cristalográficos a muy alta resolución, se determinaron coeficientes de agitación térmica²⁷ (valores Debye-Waller), que representan el desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio determinado de posiciones.²⁷ Tomando en cuenta el factor Debye-Waller para el carbono- α de los aminoácidos, el algoritmo selecciona aquellas regiones a lo largo de la secuencia, que muestren los valores de movilidad más elevados.²⁸

Los métodos para predecir epitopos de T y de B, han tenido un éxito parcial en la localización de regiones antigénicas en la superficie de las proteínas y han permitido generar antígenos capaces de inducir anticuerpos que muestren reactividad cruzada con la proteína nativa.²⁸

II. ANTECEDENTES:

Identificación de epitopos de Omp C

Una vez demostrada la participación de las porinas en la inducción de una respuesta inmune contra la fiebre tifoidea, los trabajos de predicción realizados por Martín Orozco²⁹ permitieron localizar las regiones antigénicas de la porina OmpC de *S. typhi*, susceptibles de ser reconocidas por los linfocitos B y T para generar la respuesta del hospedero.

La predicción de determinantes antigénicos para células T, se efectuó buscando manualmente patrones de Rothbard,³⁰ y empleando el programa AMPHI,^{18,20} basado en el modelo de la hélice anfipática de Margalit y Berzofsky.¹⁹ Para los linfocitos B se efectuaron las predicciones empleando los análisis de Hopp y Woods^{24,25} y Karplus y Schulz,^{24,26} basados en la hidrofiliidad y la flexibilidad de los sitios antigénicos, respectivamente.

La región de la porina comprendida entre los residuos 285-303 [LQSKGKDISNGYGASYGDQ] presentó el mayor índice de anfipatía, y un patrón de Rothbard; por lo que se le consideró un buen candidato para el epitopo de tipo T. Además se observó que contiene, en el fragmento 286-292 [QSKGKDI], una región capaz de ser reconocida por linfocitos B.

Por otro lado, la región comprendida entre los aminoácidos 247-254 [TSNGSNPS] de Omp C fue la porción más flexible y con un mediano índice de hidrofiliidad; por lo cual se le consideró una buena opción para el epitopo tipo B. Además se observó, después de alinear la secuencia de la porina Omp C de *E. coli* con la de *S. typhi*, que esta región (247-254) no es compartida por *E. coli*, sino que es específica de *S. typhi*.³⁰

Con el fin de sobreproducirlo fácilmente y conferirle mayor inmunogenicidad, el péptido 246-255 fue expresado unido a la porción amino de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), en una proteína de fusión, denominada PAP-CTB (péptido antigénico de la porina - CTB).³⁰ Para ello se empleó un sistema de sobreexpresión recombinante, el plásmido pJS752-3 (fig. 2), en el cual el gen de la CTB (*tox B*) se encuentra regulado fuertemente por el promotor *tacP*³¹.

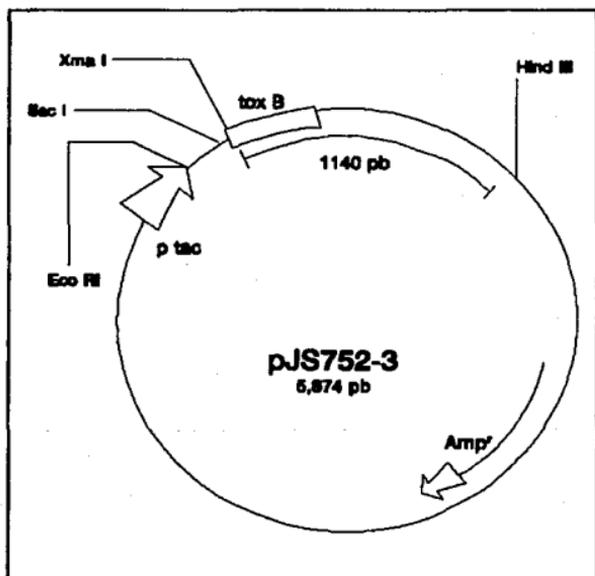


Figura 2. Mapa de restricción del plásmido pJS752-3

La CTB codificada por el gen *tox B*, es una proteína muy inmunogénica de peso molecular relativo de 11,600 Da, es secretada al medio de cultivo por la bacteria recombinante, y se fija de manera específica al gangliósido GM.³²

La construcción genética se efectuó insertando en el plásmido pJ5752-3 un oligonucleótido con el fragmento 246-255 [GTSNGSNPST] de *omp C*, entre los sitios de restricción *SacI* y *XmaI*; de tal manera que, sin alterar el marco de lectura abierto hacia *tox B*, se obtuvo una región que codifica para una proteína híbrida regulada por el mismo promotor. De este modo se obtuvo el plásmido pJAK 267 (Fig. 3) con un nuevo sitio de restricción *KpnI*.²⁰

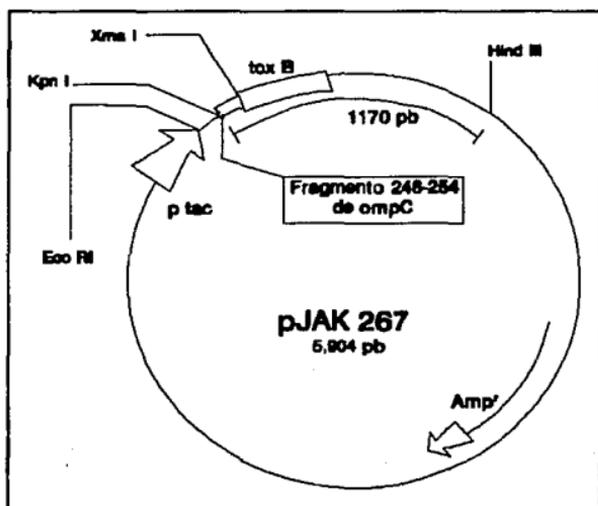


Fig. 3. Mapa de Restricción del Plásmido pJAK267, que contiene la secuencia codificante para la proteína de fusión PAP-CTB

Se indican los sitios de restricción relevantes y la zona sombreada representa el fragmento sintético correspondiente a la secuencia 246-255 de *Omp C*. Esta secuencia mantiene el marco de lectura abierto hacia la proteína CTB. Se indican el promotor *p tac* y el gen de resistencia a ampicilina.

El hecho de que en la transcripción el inserto sea leído antes que el gen *tox B*, asegura que la síntesis de CTB necesariamente conlleve la expresión del inserto. Con este nuevo plásmido pJAK267 se transformaron células de *E.coli* DH5 α y se seleccionaron dos clonas positivas, a las que se denominó *E.coli* DH5 α /pJAK y *E.coli* DH5 α /pJSS.³⁰

Se tienen así identificados dos fragmentos de la porina (246-254) y (285-303), predichos por métodos algorítmicos como epítopos de la porina capaces de inducir una respuesta en el hospedero, y resta tan solo evaluar sus propiedades inmunoquímicas.

III. OBJETIVOS

1.- Objetivo general

Evaluar por técnicas inmunoquímicas la antigenicidad de dos epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi*.

2.- Objetivos particulares

2.1 Evaluar la reactividad del péptido 246-254, contenido en la proteína de fusión, hacia los anticuerpos generados por la porina nativa.

2.2 Evaluar la respuesta inmune humoral de ratones de la cepa C3H/FeJ, frente al péptido sintético 285-303 de la porina Omp C conjugado a proteínas acarreadoras.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Región 246-254

A) Cultivo de la bacteria

Las cepas recombinantes de *E. coli* DH5 α / pJS752-3, pJAK y pJSS se sembraron, por aislamiento, en placas de agar Luria³³ con 250 μ g/ ml de ampicilina; y se seleccionaron al azar varias colonias de cada placa. Las colonias seleccionadas fueron cultivadas individualmente en 5 ml de caldo Luria³³ con 250 μ g/ ml de ampicilina, durante 16 hr a 37 °C, en un agitador automático a 175 rpm. La metodología se resume en las figuras 4a y 4b.

B) Análisis de restricción

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7500 rpm y el sedimento se empleó para la purificación de los plásmidos, mediante la técnica de "MiniPrep". Esta se basa en el método de lisis alcalina, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.³³ Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas Hind III y Kpn I, y se analizaron en un gel de agarosa al 1%, en un sistema amortiguador de Tris-boratos/EDTA (TBE) con bromuro de etidio.³³ Después de efectuar el corrimiento electroforético de los plásmidos, se observó el gel con luz ultravioleta larga (366 nm) y se fotografió.

C) Purificación de la PAP-CTB y la CTB nativa

Las proteínas totales de los sobrenadantes de los cultivos fueron precipitadas empleando una mezcla de acetona-agua (7:1), durante 24 hr a -70 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron por 15 min a 7,000 rpm y 4 °C. Los nuevos sobrenadantes fueron

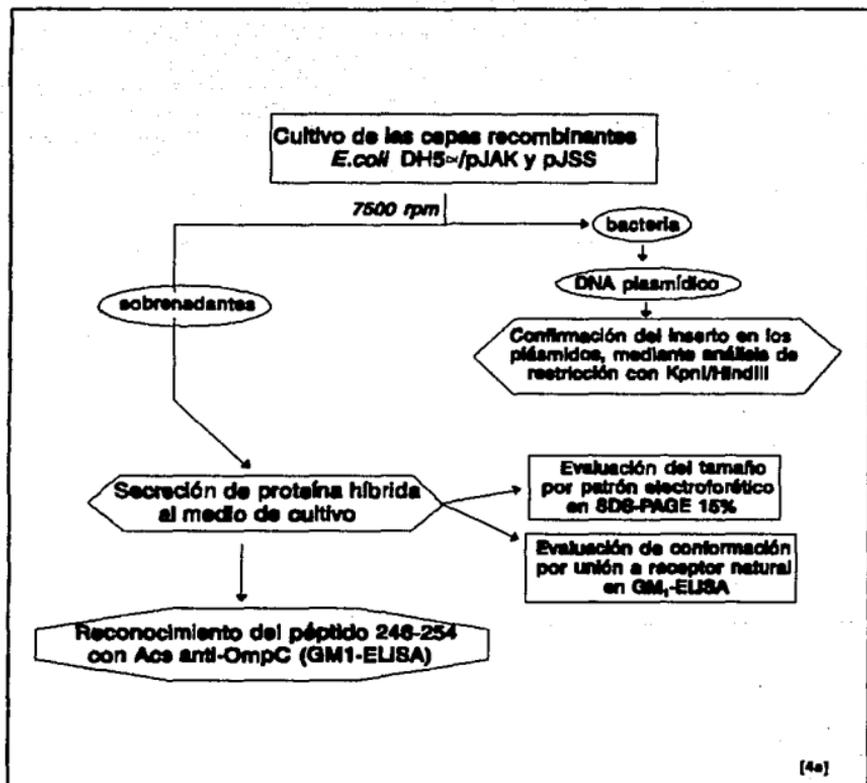


Figura 4. Estrategia empleada para confirmar que las regiones 246-254 (a) y 285-303 (b) de la porina OmpC de *S. typhi* son epítopos para linfocitos B.

Péptido sintético 285-303 de OmpC

Acoplamiento por método de carbodílimidas
a proteínas acarreadoras

BSA-péptido

KLH-péptido

Isozima-péptido

Immunización

Refuerzo

Recubrimiento de
placas para ELISA



Obtención de sueros

Titulación por ELISA de Acs anti-péptido
usando conjugado Isozima-péptido

Reactividad de los Acs anti-péptido
hacia la OmpC nativa
(por ELISA)

Demostración de la especificidad de los Acs
por la inhibición de su unión
al conjugado de Isozima

(4b)

decantados, y el sedimento seco se resuspendió en el amortiguador de muestra no-reductor [Tris 0.125 M pH 6.8 con SDS (2%), glicerol (10%) y azul de bromofenol (0.005 %)].

D) Electroforesis de proteínas

Las muestras de proteínas precipitadas de los sobrenadantes de cultivo se corrieron en electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%, por el método de Laemmli³⁴, en condiciones no reductoras. El gel concentrador se preparó con 5% de acrilamida, bis-acrilamida al 0.13%, y 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl, 0.125 M, pH 6.8. El gel espaciador consistió en acrilamida al 15%, 2.5% de bis-acrilamida y 0.19% de SDS en Tris-HCl, 0.35 M, pH 8.8. Como amortiguador de corrimiento se emplearon Tris 0.025 M, SDS 0.1% y glicina 0.192 M, a pH 8.3; en un sistema de amortiguadores discontinuos; y las muestras se corrieron a 25 mamp/placa durante un promedio de 1 hr. El gel se reveló mediante tinción de plata.³⁴

E) Titulación de la CTB

Se empleó un ensayo inmunoenzimático en fase sólida GM₁-ELISA,³⁴ en el que se recubrió la placa con 100 μ l/pozo de una solución de monosialogangliósido-GM₁, 1.5 μ M en PBS (Na_2HPO_4 1.236 g/L, NaH_2PO_4 0.18 g/L y NaCl 8.5 g/L, pH 7.2); incubando a temperatura ambiente toda la noche. Se bloqueó con PBS-gelatina (2%). Se añadieron los sobrenadantes a investigar y también se preparó, dentro del mismo sistema, una curva de calibración con CTB comercial [GIBCO BRL Cholera Toxin B Subunit Cat# 3172SA]. Se añadió, como primer anticuerpo, un suero policlonal anti-CTB desarrollado en conejo; y como segundo anticuerpo se adicionó el conjugado anti-conejo [GIBCO BRL]. Se dejó desarrollar el color con el sustrato (o-feniléndiamina "OPD" 10 mg/dl, amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.6 y H_2O_2 1 μ l/ml), y deteniendo la reacción a los 10 min con H_2SO_4 2.5 N. Las lecturas de absorbancia a 490 nm se

obtuvieron con un lector de ELISA (Ortho Diagnostic Systems, MTP-120 Microplate Reader).

F) Identificación del péptido

Con el mismo sistema de GM,-ELISA, se efectuó otro ensayo añadiendo como primer anticuerpo un suero policlonal anti-porinas. Se reporta el reconocimiento del péptido en términos de las lecturas de absorbancia a 490 nm.

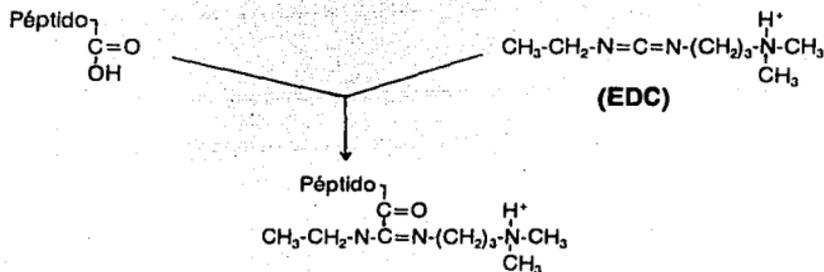
2.- Región 285-303.

A) Síntesis

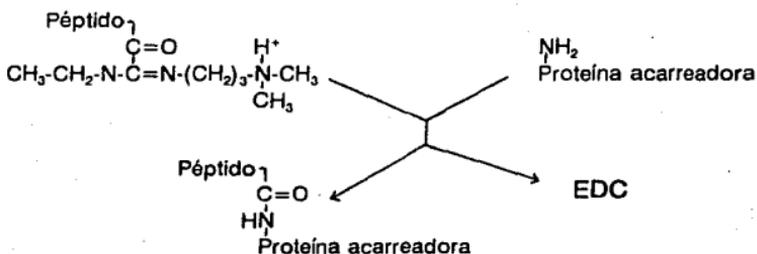
El péptido 285-303 se sintetizó en trabajos previos,²⁹ empleando la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida, con la química de los derivados F-moc en poliamida,^{37,38,39} en un sintetizador PS-3 de *Protein Technologies Inc.* (Tucson, Az.,EUA). Se obtuvo con una pureza del 75% al pasarlo por una columna C-18 de fase reversa, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

B) Conjugación a proteínas acarreadoras.

El péptido sintético se conjugó, empleando el método de carbodilimidias, a tres acarreadores diferentes: albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina (KLH) y lisozima; para lo cual se empleó un kit de conjugación *Imject immunogen EDC Conjugation Kit with BSA and KLH* (No. 77101 G) de *Pierce*. Este método se basa en la activación de grupos caboxilos por el hidrocloreuro de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodilimida (EDC), y su posterior reacción con aminas primarias. (fig. 5)



I.- Inicialmente la carbodilimida reacciona con los grupos carboxilo disponibles en el péptido, formando un intermediario activo O-aci-urea.



II.- El grupo carboxilo activado reacciona entonces con una amina primaria, formando un enlace amida, y liberando el mediador EDC como derivado soluble de urea.

Fig. 5. Reacciones de Conjugación con la carbodilimida EDC.

Las mezclas de reacción se purificaron por filtración en gel empleando columnas de exclusión molecular de dextranas y se colectaron fracciones de 0.5 ml. Se determinó su absorbancia a 280 nm.

C) Esquema de inmunización

Los conjugados se emplearon para inmunizar ratones de la cepa C3H/FeJ, hembras y de 6 semanas de edad, (donados por el Instituto Nacional de Higiene, SSA.); según el siguiente protocolo:

Día 0: Inmunización subcutánea con 200 μg del conjugado BSA-péptido en adyuvante completo de Freund por cada ratón

Día 7: Refuerzo con 100 μg del conjugado péptido-KLH por vía intravenosa.

Día 14: Sangrado de los ratones y obtención de los sueros de manera individual.

D) Evaluación Inmunoquímica de los sueros de ratón

a.- Titulación de los sueros

Los sueros se titularon mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA),⁴⁰ según se describe brevemente a continuación. Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Nunc Co), con 5 μg /pozo del conjugado lisozima-péptido en amortiguador de carbonatos (pH 9.5). Se bloqueó con una solución de PBS-gelatina (3%), y se añadieron los sueros de los ratones en diluciones seriadas de 1:50 hasta 1:3200. Como segundo anticuerpo se añadió el conjugado [Sigma Co. anti-mouse IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate] en dilución 1:1000. Se reveló la placa de igual manera que los ensayos inmunoenzimáticos anteriores.

b.- Ensayo con la proteína nativa.

Se recubrieron las placas de ELISA con 2 μg /pozo de la porina recombinante (rOmp C), obtenida de la cepa *E. coli* UH302 pST13 por el método de Nikaido*. Se realizó el ensayo del mismo modo que los anteriores, y se reportó el reconocimiento de la proteína nativa por los sueros inmunes.

c.- Ensayo de competencia.

Se realizó el ensayo de ELISA de manera similar al señalado en inciso (a.); con la diferencia de que los sueros de ratón se incubaron junto con el péptido libre en concentraciones variables (desde 10^{-3} a 10^{-7} M). Los resultados de absorbancia a 490 nm se reportan en términos de porcentaje de inhibición de la interacción de los anticuerpos anti-conjugado con el antígeno.

V. RESULTADOS

1.- Proteína de fusión PAP-CTB

A) Análisis de restricción de la construcción genética

Se seleccionaron algunas colonias de las cepas de *E. coli* DH5 α /pJAK y *E. coli* DH5 α /pJSS, y el DNA purificado del plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Hind III/Kpn I. El análisis por electroforesis en gel de agarosa se muestra en la figura 6; en el cual se observan los plásmidos pJSS y pJAK (carriles 1 y 2), con dos bandas cada uno, de aproximadamente 1.2 kb y 4.7 kb respectivamente; mientras que el plásmido original pJS752-3 (carril 3), solo presenta una banda de aproximadamente 5.9 kb.

B) Electroforesis de la CTB y la PAP-CTB en gels de poliacrilamida en condiciones reductoras

La figura 7 muestra los resultados obtenidos cuando se analizaron en condiciones reductoras los sobrenadantes de las cepas *E. coli* DH5 α /pJS752-3, pJAK y pJSS. Se observa que la movilidad electroforética de la proteína híbrida PAP-CTB (carriles 1 y 2) es menor a la de la CTB nativa generada por el plásmido pJS752-3 (carril 3).

C) Titulación de CTB en los sobrenadantes de cultivo

Se investigó la expresión de la proteína híbrida mediante la técnica de GM₁-ELISA, empleando como estándar una curva patrón de CTB. Los resultados se grafican en la figura 8, donde se observa que la cantidad de PAP-CTB (determinada como concentración equivalente de CTB), producida por las cepas *E. coli* DH5 α /pJAK y pJSS, es muy semejante a la obtenida por las colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido original pJS752-3.

D) Identificación del péptido 246-254 en la proteína híbrida con el suero anti-porinas

Se tituló la proteína de fusión PAP-CTB en los sobrenadantes de cultivo, mediante un sistema de GM₁-ELISA, en el cual se empleó un suero policlonal anti-porinas desarrollado en conejo. En la figura 9 se observa que el suero reconoce a la proteína de fusión secretada por las clonas pJAK y pJSS, de dos a tres veces más que al sobrenadante de la cepa no recombinante *E. coli* DH5 α y que a la CTB nativa de la clona pJS752-3.

2.- Péptido 285-303

A) Conjugados

Los conjugados eluyeron en las fracciones 5, 6 y 7 monitoreadas por absorbancia a 280 nm, y se emplearon en el esquema de inmunización descrito en materiales y métodos.

B) Titulación de anticuerpos anti-conjugado

Los sueros de los ratones inmunizados con los conjugados BSA-péptido y KLH-péptido se titularon mediante el ensayo de ELISA, empleando como antígeno el conjugado lisozima-péptido. Los resultados se muestran en la figura 10, donde puede observarse que el título en los sueros de los ratones inmunizados es tres veces mayor que el título previo a la inmunización.

C) Reactividad de los anticuerpos anti-péptido con la porina Omp C nativa

La figura 11 muestra que los sueros anti-conjugados BSA-péptido y KLH-péptido reconocieron en los ensayos de ELISA, a la porina fijada a la placa. Los sueros de los ratones inmunizados mostraron un título mayor que el de los mismos animales antes de ser inmunizados.

D) Ensayo de competencia

Los sueros de los ratones se incubaron a una concentración constante, en presencia de concentraciones crecientes del péptido libre. Los resultados, presentados en la figura 12, muestran una disminución en la capacidad de los anticuerpos para reconocer al conjugado lisozima-péptido, al incrementar la concentración del péptido libre. El porcentaje de inhibición de estos sueros, al añadir péptido libre en concentración 10^{-8} M, fue de 42%. El comportamiento de la curva de inhibición muestra la presencia de más de una familia de anticuerpos; una capaz de ser inhibida por cantidades tan pequeñas como de 10^{-7} M de péptido libre; y otras menos susceptibles, aún frente a cantidades mayores (10^{-6} - 10^{-3})M del péptido.

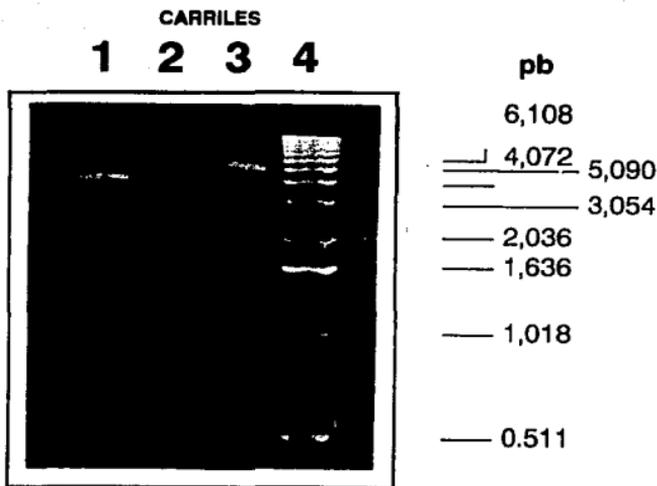


Figura 6. Confirmación de la presencia del inserto en los plásmidos pJAK y pJSS.

Se purificaron tanto el plásmido original pJS752-3, como las construcciones pJAK y pJSS. Se efectuó el análisis de restricción con una digestión con Hind III/Kpn I y con un análisis posterior por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa la fotografía del gel (luz UV). **Carril 1:** plásmido pJSS; **Carril 2:** plásmido pJAK; **Carril 3:** plásmido pJS752-3; **Carril 4:** Marcador de longitud de DNA (GIBCO 1 Kb Ladder).

CARRILES

1 2 3 4 5



Daltons

— 21,500

— 14,400

Figura 7. Evaluación del tamaño de la proteína híbrida PAP-CTB producida y secretada por las bacterias recombinantes.

Se efectuó una por electroforesis en poliacrilamida-SDS en donde se comparan el contenido de los sobrenadantes de los cultivos de DH5 α /pJAK y DH5 α /pJSS (PAP-CTB), con el de DH5 α /pJS752-3 (CTB-nativa). Los sobrenadantes se trataron con una mezcla acetona-agua (7:1), y los precipitados se resuspendieron en amortiguador de muestra no-reductor.

Carril 1: PAP-CTB (codificada por el plásmido pJAK). **Carril 2:** PAP-CTB (codificada por el plásmido pJSS). **Carril 3:** CTB (codificada por el plásmido pJS752-3). **Carril 4:** marcadores de peso molecular (Inhibidor de tripsina 21.5 kDa y Isozima 14.4 kDa). **Carril 5:** CTB comercial (GIBCO BRL).

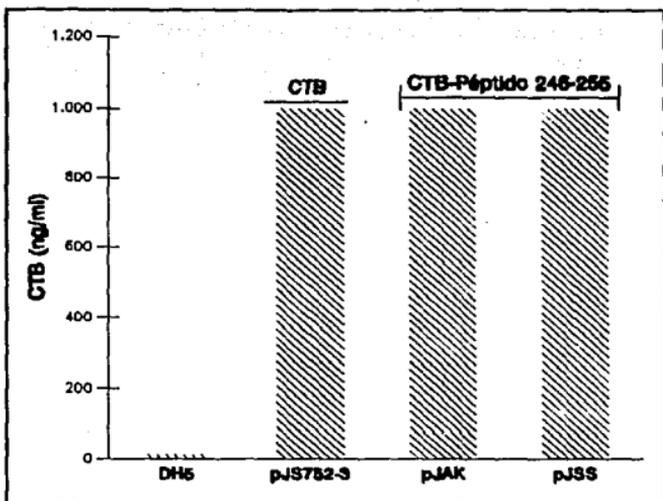


Figura 8. Evaluación de la conformación de la CTB en la proteína híbrida, por la unión a su receptor natural

Las bacterias fueron cultivadas durante 24 hr en caldo Luria con ampicilina y se tituló la CTB secretada al medio, con un ensayo por GM-ELISA. Se fijó a la placa el gangliósido GM₁ (0.15 μ M/pozo) y se añadieron los sobrenadantes de los cultivos correspondientes. Simultáneamente se elaboró una curva patrón, añadiendo a los pozos que contenían GM₁ diluciones seriadas de CTB comercial (GIBCO BRL). Después se adicionó a todos los pozos un suero policlonal, desarrollado en conejo, anti-CTB en dilución (1:100); y se reveló con conjugado anti-conejo-peroxidasa y sustrato. La proteína híbrida PAP-CTB, producida por las copas pJAK y pJSS se titula como concentración equivalente de CTB. (DH5Q: es la cepa no recombinante empleada como control; pJS752-3: es la cepa recombinante).

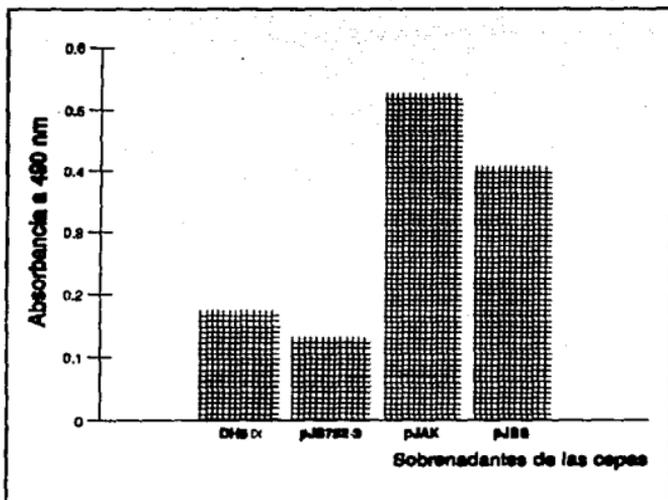


Figura 9. Identificación del péptido 246-254 en la proteína híbrida PAP-CTB, con anticuerpos policlonales anti-porina OmpC.

Se efectuó un ensayo por OM-ELISA, se fijó el gangliósido a la placa, y se añadieron los sobrenadantes de los cultivos de las cepas recombinantes, DH5Q/pJAK y pJSS (productoras de la PAP-CTB), DH5Q/pJS752-3 productora de CTB, y DH5Q no transformada.

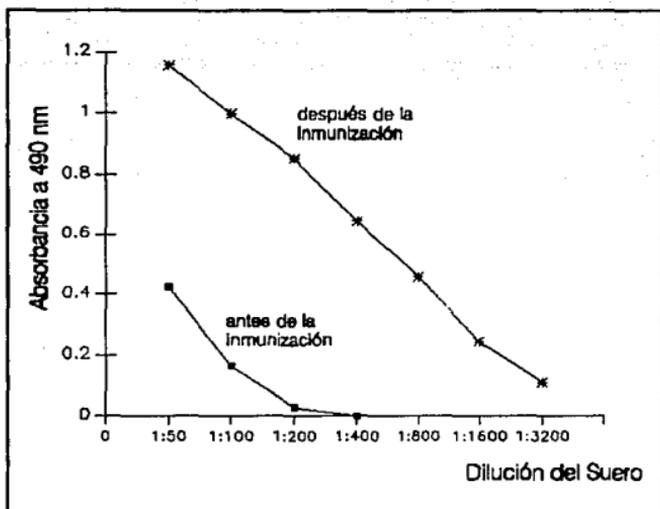


Figura 10. Titulación de los anticuerpos anti-peptido 285-303 en el suero de un ratón inmunizado con los conjugados BSA-peptido y KLH-peptido. Se inmunizaron ratones C3H/FeJ con 200 μg del péptido 285-303 de Omp C, conjugado a BSA, y se reforzaron a los siete días con 100 μg del conjugado KLH-peptido. Una semana después se titularon los sueros de los ratones en un ensayo por ELISA, empleando como antígeno el conjugado lisozima-peptido (5 μg /pozo), y revelando la interacción con conjugado anti-ratón-peroxidasa y sustrato. La absorbancia se determinó a 490 nm. Las curvas indican el título de un suero representativo, previo a la inmunización (*), y siete días después de inmunizados los ratones (■).

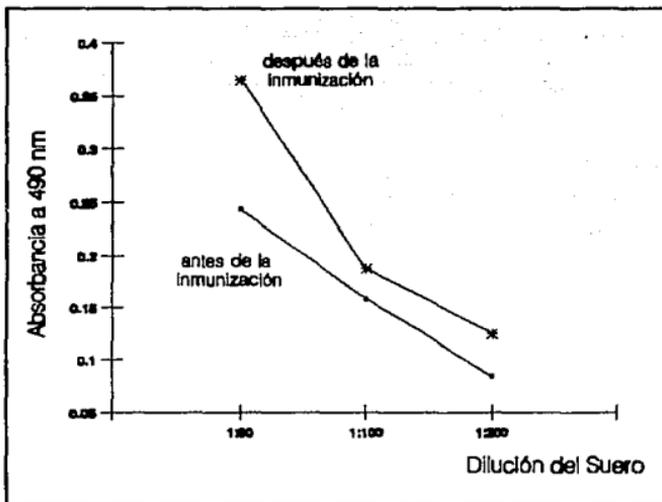


Figura 11. Reactividad de los anticuerpos anti-péptido 285-303 con la porina Omp C en su forma nativa.

La porina recombinante rOmp C en su forma nativa, se fijó a la placa para ELISA (2 μ g/pozo) y se añadieron diferentes diluciones de los sueros de los ratones inmunizados con los conjugados BSA-péptido y KLH-péptido. La interacción se reveló con el conjugado anti-ratón-peroxidasa y se determinó la absorbancia a 490 nm. La gráfica muestra el comportamiento antes (=), y una semana después de la inmunización (*).

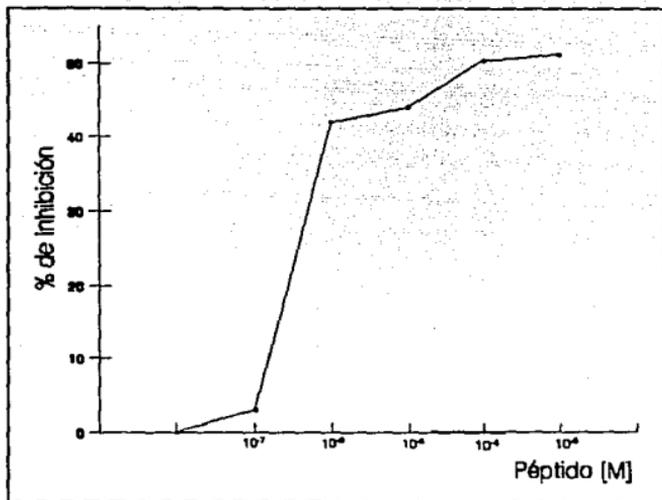


Figura 12. Especificidad de los anticuerpos anti-péptido 285-303, demostrada mediante la inhibición de su interacción con el conjugado de lisozima, por la presencia del péptido libre.

Se efectuó un ensayo de competencia, en el que se fijó a la placa para ELISA el conjugado lisozima-péptido (5 μ g/pozo), y se incubaron, a concentración constante, los sueros de los ratones inmunizados con los conjugados BSA-péptido y KLH-péptido. Se añadió además el péptido libre, en concentraciones crecientes, para competir contra el conjugado, por la unión a los anticuerpos. Se calculó el por ciento de inhibición de acuerdo a la disminución en las lecturas de la absorbancia (490 nm), conforme a la adición del péptido libre.

VI. DISCUSIÓN

La participación de las porinas de *S. typhi* en la inducción de la respuesta inmune contra la fiebre tifoidea ha sido estudiada en diversos trabajos; por medio de los cuales se ha demostrado su capacidad para estimular mecanismos efectores, tanto humorales como celulares, en modelos murinos.^{7,8,9,10,11,12,13} Con base en estos hallazgos y buscando un conocimiento más profundo sobre los mecanismos inmunológicos involucrados en torno a las porinas, se han predicho los determinantes antigénicos de la porina *Omp C* de *S. typhi*,²⁰ mediante análisis algorítmicos de la secuencia de la proteína reportada por Calva y cols.⁴² A partir de estas predicciones se seleccionaron dos regiones 246-254 [TSNGSNPS] y 285-303 [LQSKGKDISNGYGASYGDQ], para su evaluación inmunoquímica.

La predicción algorítmica de epitopos, basada en las características fisicoquímicas atribuidas a los determinantes antigénicos,^{21,22,24,25} ha agilizado la caracterización inmunológica de la respuesta a diversos antígenos. Estas predicciones sin embargo, no son suficientes para calificar a las regiones como epitopos; sino que se requiere la evaluación inmunoquímica de los fragmentos elegidos.

El segmento 246-254 [TSNGSNPS] de la porina se eligió para evaluarlo inmunoquímicamente, por presentar características reportadas como típicas de los epitopos reconocidos por los linfocitos B; y una región específica de *S. typhi*, no compartida por la porina *Omp C* homóloga de *E. coli*. Para su estudio se decidió emplear la proteína de fusión PAP-CTB,³⁰ producto de una construcción genética entre la subunidad B recombinante de la toxina del cólera

(rCTB)³¹ y el péptido 246-254 de *Omp C*; debido a que la CTB ha sido empleada con éxito como portadora de diversos epítomos.^{43,44,45} La CTB es una proteína muy inmunogénica, soluble en agua, resistente a proteólisis, y mantiene su actividad biológica después de ser desnaturada y renaturalizada; lo cual favorece su utilidad como acarreador de determinantes antigénicos.³²

El patrón electroforético de las digestiones de los plásmidos pJS752-3, pJAK y pJSS con las enzimas KpnI y HindIII, fue consistente con lo esperado (fig. 6). El plásmido pJS752-3 contiene el sitio Hind III (fig. 2); pero no presenta el sitio de restricción KpnI, debido a que éste se generó después la inserción del oligonucleótido. Por lo tanto, la única banda generada en pJS752-3 por la digestión con ambas enzimas corresponde al plásmido linealizado (5,874 pb). Los plásmidos de las cepas DH5 α /pJAK y DH5 α /pJSS sí presentan ambos sitios de restricción (fig. 3), y por lo tanto se generan dos bandas con la digestión. El fragmento pequeño (aprox. 1.2 kb) corresponde al fragmento de DNA de 1,170 pb, en cuyo extremo 5' se encuentra el oligonucleótido (30 pb) insertado en el inicio del gen de la CTB. El fragmento más pesado (aprox. 4.7 kb) identifica al resto del plásmido de 4,734 pb. Con estos resultados se confirma gráficamente la presencia del inserto, portador de la información para la región 246-254 de la porina, en los plásmidos de las cepas DH5 α /pJAK y DH5 α /pJSS.

El cambio en la movilidad electroforética (fig. 7) de la proteína PAP-CTB comparado con la de la CTB nativa, sugiere fuertemente la presencia del inserto (30 aa; \approx 3,000 Da), en la CTB secretada por las cepas DH5 α /pJAK y DH5 α /pJSS. Sin embargo, la prueba definitiva de la construcción del vector solo es posible con el análisis de las secuencias nucleotídica y proteica del pJAK y de la PAP-CTB respectivamente.

La titulación de CTB en los sobrenadantes de cultivo, utilizando el sistema GM₁-ELISA (fig. 8), demuestra que la proteína PAP-CTB es funcional como CTB; debido a que es secretada al medio, se une al gangliósido GM₁, y es reconocida por los anticuerpos anti-CTB. Ello indica que las características de expresión de la CTB no se ven afectadas por la inserción del péptido de la porina en su extremo amino terminal; y se muestra, de manera indirecta, que la información del oligonucleótido insertado está siendo transcrita correctamente, sin alterar el marco de lectura del gen *tox B*.

En el ensayo con el suero anti-porinas (fig. 9) se observa un reconocimiento específico de la PAP-CTB secretada por las clonas recombinantes *E. coli* DH5 α /pJAK y *E. coli* DH5 α /pJSS. La reactividad del suero ante los sobrenadantes de las cepas control, DH5 α y DH5 α /pJS752-3, es menor al de las cepas positivas, lo cual resulta común cuando se emplean sueros policlonales.

Con estos resultados se puede concluir que el péptido 246-255 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, acarreado por la CTB, es reconocido por anticuerpos dirigidos contra la proteína en su forma nativa. Ello a su vez indica a) que esta región seleccionada por algoritmos de predicción, sí es un epitopo de la porina Omp C, capaz de ser reconocido por anticuerpos; b) que el péptido, unido al extremo amino terminal de la CTB en la proteína híbrida, queda expuesto al medio externo; y c) que la conformación adoptada por el péptido en la CTB es adecuada para su unión al paratopo de los anticuerpos anti-porinas, y quizá sea muy semejante a la que adopta dentro de la proteína nativa.

El fragmento 285-303 [LQSKGKDISNGYGASYGDQ] de la porina se eligió por sus propiedades anfipáticas, atribuidas a un epitopo de las células T según Berzofsky,¹⁹ y por

contener a su vez un epitopo para células B. Ya que se dispone del péptido sintético de esta región, se acopló a diferentes proteínas acarreadoras y se confirmó su potencial como epitopo de la porina Omp C de *S. typhi*.

Los péptidos sintéticos generalmente requieren ser acoplados a proteínas acarreadoras inmunogénicas, de modo que sean capaces de generar una respuesta específica de anticuerpos anti-péptido. Entre los métodos de conjugación se encuentra el de las carbodiimidas, las cuales permiten acoplar grupos amino y carboxilo, como se muestra en la figura 5. Se eligió el método que emplea una carbodiimida soluble en agua (EDC), puesto que se ha demostrado que permite obtener respuestas elevadas de anticuerpos dirigidos contra los péptidos sintéticos acoplados, logrando además niveles mínimos de anticuerpos contra otros epitopos del conjugado, denominados "neodeterminantes".⁴⁶ Con la finalidad de dirigir la respuesta de los ratones hacia el péptido y no hacia la proteína acarreadora, se emplearon conjugados diferentes para las dos inmunizaciones de los ratones y los ensayos de ELISA de los sueros.

En la titulación de los sueros policlonales de los ratones inmunizados (fig. 10), donde el título después de la inmunización fue casi tres veces mayor que el control, se demuestra la presencia de anticuerpos dirigidos contra el péptido 285-303. Esta observación comprueba que el péptido 285-303 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, acoplado por el método de carbodiimidas a proteínas acarreadoras, es capaz de inducir en los ratones una respuesta humoral específica contra el péptido.

Los mismos sueros de los ratones inmunizados reconocieron también, en una dilución 1:50, a 2 µg de la porina nativa (fig. 11). El péptido 285-303 corresponde tan solo a una pequeña

región (10 aa) de la porina, y sin embargo los anticuerpos inducidos por él son capaces de interactuar con la proteína en su forma nativa. Este hecho muestra que el fragmento 285-303, es una región expuesta en la superficie de la proteína nativa, y constituye un determinante antigénico reconocible por los linfocitos B. De este modo se confirma la predicción teórica del péptido como un epitopo de la porina.

La figura 11 también muestra que a mayores diluciones del suero anti-conjugado, el título obtenido no difiere mucho del título del suero control. Esta baja interacción del suero con la porina puede deberse a que el suero empleado es un suero policlonal; lo cual implica que no todos los anticuerpos presentes están necesariamente dirigidos de manera específica contra el péptido 285-303 de la porina, sino también contra otros determinantes antigénicos generados por el acoplamiento del péptido. Esta posibilidad se confirma en el ensayo de competencia, en el cual el péptido libre y el conjugado fijado a la placa compiten por el reconocimiento de los anticuerpos presentes en el suero. La curva de inhibición de la interacción del suero con el conjugado fijado a la placa (fig. 12), muestra que a una concentración del péptido de 10^{-6} M la inhibición es del 42% y ya no aumenta a concentraciones mayores. El hecho de que la actividad del suero no sea inhibida por completo, posiblemente se deba a la presencia de familias de anticuerpos de menor afinidad por el péptido. Estos anticuerpos podrían estar dirigidos contra segmentos incompletos de la región 285-303, como pueden ser el extremo libre o el extremo unido a la proteína acarreadora; y por lo tanto su afinidad por el péptido libre no sería la misma que la de los anticuerpos dirigidos contra segmentos centrales del péptido. Otra explicación de la inhibición incompleta es, que el suero empleado haya estado muy concentrado (1:800), y por lo tanto la cantidad de péptido no fuera suficiente para inhibir al 100% su actividad. De cualquier modo, lo que sí es evidente es la presencia de anticuerpos dirigidos de manera específica contra el

péptido, y capaces de reconocer a la porina en su forma nativa.

Las predicciones de epitopos por medio de algoritmos se realizaron antes de que se conociera en detalle la estructura cristalográfica de la porina Omp F de *E. coli* (fig. 1) reportada por Cowan y Rosenbusch en 1992.² Después de alinear las secuencias de Omp F de *E. coli* y Omp C de *S. typhi*, se efectuó en nuestro laboratorio una aproximación de la estructura secundaria de la porina Omp C, representada en la figura 13. En ella se observa que el péptido 246-255 está localizado en el asa L6 y el péptido 285-303 en L7; lo cual confirma su comportamiento como epitopos para linfocitos B, pues quedan expuestos en la superficie de la porina, y accesibles al reconocimiento de los anticuerpos.

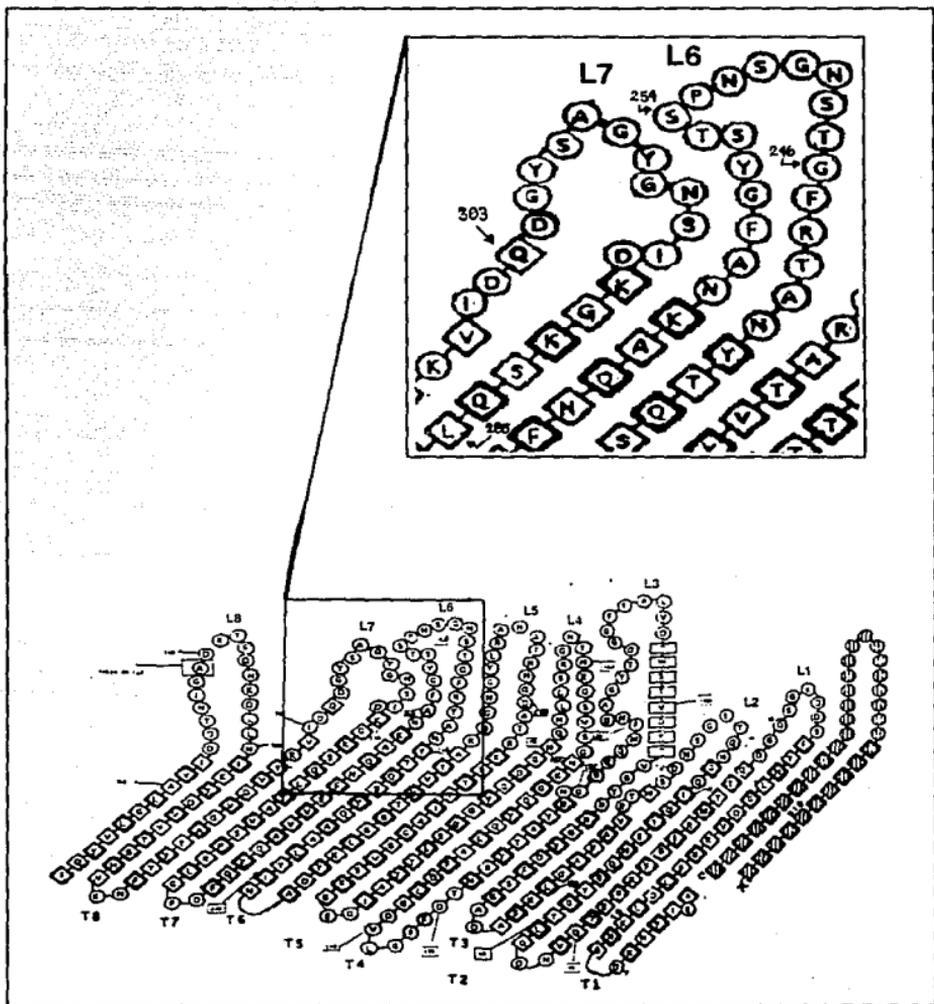


Figura 13. Estructura secundaria propuesta para la porina Omp C de *S. typhi* a partir de una comparación con los resultados de Cowan.²

VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La caracterización inmunoquímica de las regiones 246-255 y 285-303 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, seleccionadas a partir de predicciones algorítmicas de epitopos, demuestra que ambos fragmentos constituyen epitopos de la porina, capaces de ser reconocidas por los linfocitos B.

Se demostró que la conjugación por el método de carbodiimidas en solución es útil para conferir inmunogenicidad al péptido sintético 285-303 (de 19 aminoácidos), y que le permite ser caracterizado por técnicas inmunoquímicas.

La expresión del péptido 246-254 en el extremo amino de la CTB aparentemente no modifica la estructura ni las propiedades de la proteína; y propicia que, de algún modo, el péptido adopte en el híbrido su conformación original. Las construcciones genéticas, como la de la PAP-CTB, proporcionan una herramienta poderosa para la evaluación de los fragmentos antigénicos de las moléculas proteicas. El hecho de sintetizar el fragmento de la porina *in vivo*, presenta la ventaja de poder producirlo a gran escala y tener un sistema de purificación eficiente y rápido; comparado con los métodos bioquímicos tradicionales de extracción de porinas con detergentes. Además se tiene la ventaja de que la proteína de fusión es relativamente estable, secretada al medio y conserva sus propiedades de CTB. Por lo tanto, las mismas estrategias de expresión pueden ser empleadas para la evaluación de una variedad de antígenos proteicos polivalentes y para su futura aplicación en la inmunización.

El mapeo de epitopos en la porina Omp C de *Salmonella typhi* es un paso importante en el estudio de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune generada contra la fiebre

tifoidea. En un proyecto a corto plazo será necesario analizar la capacidad de las regiones 246-254 y 285-303 de la porina, y de otros epitopos, para generar una respuesta inmune protectora en animales y en humanos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. **Nikaldo, H. y Vaara, M.** (1987). Outer membrane. En: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (Eds.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA. págs:7-22.
2. **Cowan, S.W., Schirmer, G., Rummel, G., Stelert, M., Ghosh, R., Paupit, R.A., Jansonius, J.N. y Rosenbusch, J.P.** (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**:727-733.
3. **Benz, R. y Bauer, K.** (1988). Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* **176**:1-19.
4. **Bosch, D., Scholten, M., Verhagen, C. y Tommassen, J.** (1989). The role of the carboxy-terminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* **216**:144-148.
5. **Struyvé, M., Moons, M. y Tommassen, J.** (1991). Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* **218**:141-148.
6. **Overbeeke, N., Bergmans, H., van Maxsfeld, F. y Lugtemberg, B.** (1983). Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **163**:513-532.
7. **Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. y Kumate, J.** (1988). Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d.Vi. *Infect. Immun.* **56**:2953-2959.
8. **Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C.R., García, J.A. y Kumate, J.** (1992). Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* **10**:811-813.
9. **Isibasi, A., Ortiz, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C. y Kumate, J.** (1988). The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever: monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. En: Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. y Jaz, J. (Eds.). *Cell function and disease*. Plenum Press. N.Y. págs:281-292.
10. **Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., González, C., García, J.A., Isias, S. y Kumate, J.** (1989). Anticuerpos monoclonales anti-lipopolsacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d: análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* **20**:315-320.

11. **Ortiz,V., Isibasi,A., García-Ortigoza,E. y Kumate,J.** (1989). Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1640-1645.
12. **Blanco,F., Isibasi,A., González,C.R., Ortiz,V., Paniagua,J., Arreguín,C. y Kumate,J.** (1993). Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**:73-80.
13. **González,C.R., Isibasi,A., Ortiz-Navarrete,V., Paniagua,J., García,J.A., Blanco,F. y Kumate,J.** (1993). Lymphocytic proliferative response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* **37**:(en prensa).
14. **Van Regenmortel,M.H.V..** (1986). Which structural features determine protein antigenicity? *TIBS* **11**:36-39.
15. **Saul,A.J. y Geysen,H.M.** (1990). Identification of epitopes through peptide technology. En: Woodrow,G.C. y Levine,M.M. (Eds.). *New generation vaccines*. Marcel Dekker, Inc. N.Y.,USA. págs:117-126.
16. **Berkower,I., Buckenmeyer,G.K., Gurd,F.R.N. y Berzofsky,J.A.** (1982). A possible immunodominant epitope recognized by murine T lymphocytes immune to different myoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:4723-4727.
17. **Berkower,I., Kawamura,H., Matis,L.A. y Berzofsky,J.A.** (1985). T cell clones to two major T cell epitopes of myoglobin: effect of *I-A/I-E* restriction on epitope dominance. *J. Immunol.* **135**:2628-2633.
18. **Margalit,H., Spouge,J.L., Cornette,J.L., Cease,K.B., DeLisi,C. y Berzofsky,J.A.** (1987). Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* **138**:2213-2229.
19. **DeLisi,C. y Berzofsky,J.A.** (1985). T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:7048-7052.
20. **Bairoch,A.** (1990). PCGENE: the nucleic acid and protein sequence analysis software system. (TM) IntelliGenetics Inc. University of Geneva, Switzerland.
21. **Margalit,H., DeLisi,C. y Berzofsky,J.A.** (1990). Computer prediction of T-cell epitopes. En: Woodrow,G.C. y Levine,M.M. (Eds.) *New generation vaccines*. Marcel Dekker, Inc. N.Y.,USA. págs:109-116.
22. **Rothbard,J.B. y Taylor,W.R.** (1988). A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* **7**:93-100.
23. **Falk,K., Rötzschke,O. y Rammensee,H.-G.** (1990). Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **348**:248-251.

24. Falk,K., Röttschke,O., Deres,K., Metzger,J., Jung,G. y Rammensee,H.-G. (1991). Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* **174**:425-434.
25. Röttschke,O., Falk,K., Faath,S. y Rammensee,H.-G. (1991). On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* **174**:1059-1071.
26. Hopp,T.P. y Woods,K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:3824-3828.
27. Karplus,M. y McCammon,A. (1983). Dynamics of proteins: elements and function. *Ann. Rev. Biochem.* **53**:263-300.
28. Gao,X.-M., Liew,F.Y. y Tite,J.P. (1989). Identification and characterization of T helper epitopes in the nucleoprotein of influenza A virus. *J. Immunol.* **143**:3007-3014.
29. Martín Orozco,N. (1992). Péptidos sintéticos de porinas de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. Fac. Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México,D.F., México.
30. Paniagua,J., Sánchez,J., Ramírez,G., López-Santibáñez,M., Orozco,N., Isibasi,A. y Kumate,J. (1992). Genetic construction of a hybrid protein containing a *Salmonella typhi* Omp C porin epitope. *Arch. Med. Res.* **23**:200.
31. Sánchez,J. y Hölmgren,J. (1989). Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:481-485.
32. Spangler,B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microb. Reviews* **56**:622-647.
33. Sambrook,J., Fritsch,E.F. y Maniatis,T. (Eds.) (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, New York, U.S.A. págs. 1.21-1.24 y 1.38-1.39.
34. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
35. Coligan,J.E., Krusibeek,A.M., Margulies,D.H., Shevach,E.M. y Strober,W. (Eds.) (1992). Current protocols in immunology. National Institutes for Health. Greene Publishing Association and Wiley-Interscience, N.Y. U.S.A. págs. 2.1.7 y 8.9.4.
36. Svennerholm,A.M. y Hölmgren,J. (1978). Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* **1**:19-23.

37. **Atherton,E., Clive,D.L.J. y Sheppard,R.C.** (1975). Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* **97**:6584-6585.
38. **Arshady,R., Atherton,E., Clive,D.L.J. y Sheppard,R.C.** (1981). Peptide synthesis. Part 1. Preparation and use of polar supports based on poly(dimethylacrylamide). *J.C.S. Perkin I*:529-537.
39. **Atherton,E., Logan,C.J. y Sheppard,R.C.** (1981). Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using *N*α-fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J.C.S. Perkin I*:538-546.
40. **Engvall,E. y Perlmann,P.** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**:871-874.
41. **Nikaido,H.** (1983). Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* **97**:85-100.
42. **Venegas,A., Gómez,I., Zavor,I. y Yudelevich,A.** (1988). The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi omp C* porin gene. *Nucleic Acids Res.* **16**:7721.
43. **Sánchez,J., Johansson,S., Löwenadler,B., Svennerholm,A.M. y Hölmgren,J.** (1990). Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res. Microbiol.* **141**:971-979.
44. **Sánchez,J., Svennerholm,A.-M. y Hölmgren,J.** (1988). Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. *FEBS Letters* **241**:110-114.
45. **González García-Conde,R.** (1992). Fusión de un epítope de neutralización de rotavirus a la subunidad B de la toxina de cólera. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. U.N.A.M. Cuernavaca, Mor.
46. **Deen,C., Claassen,E., Gerritse,K., Zegers,N.D. y Boersma,W.J.A.** (1990). A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides. Enhanced anti-peptide antibody responses. *J. Immunol. Methods* **129**:119-125.