



11281  
8029

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION

"ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE

A PEPTIDOS DE PORINAS DE *Salmonella typhi*"

T E S I S

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
- INMUNOLOGIA -

JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

ASESOR: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO

MEXICO, D.F.

1996



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN

Las porinas son las proteínas más abundantes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y son proteínas transmembranales que funcionan como canales de difusión facilitada para moléculas de bajo peso molecular (600 KDa). Se ha demostrado que el complejo de las porinas de *Salmonella typhi*, juega un papel importante en la inducción de inmunidad protectora contra el reto de la bacteria homóloga, en el modelo murino. De este complejo, la porina OmpC participa en el proceso de inducción de protección. Para identificar regiones potencialmente antigénicas y estudiar la topología de esta proteína, se procedió a alinear las secuencias de las porinas OmpC de *S. typhi* y *Escherichia coli*, en donde se observó que, de acuerdo al modelo cristalográfico de OmpF de *E. coli*, los segmentos 246-255 y 290-303 corresponderían a las asas extracelulares 6 y 7 de la OmpC de *S. typhi*, además de que la región 246-254 es exclusiva de *S. typhi*. Por otro lado, estas regiones están predichas como zonas potencialmente inmunogénicas para el reconocimiento por linfocitos B. Se sintetizaron químicamente dichos péptidos, el péptido unido a la resina se emulsificó con adyuvante completo de Freund y se inmunizaron ratones de manera independiente. Los anticuerpos resultantes fueron capaces de reconocer tanto a la proteína nativa como a la bacteria completa. Para realizar el ratteo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra estas regiones, se construyeron proteínas de fusión entre la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) y las secuencias descritas, que por comparación con la porina OmpF de *E. coli* corresponderían a las asas 6 y 7 respectivamente. Se sintetizaron oligonucleótidos codificantes para dichas secuencias y se insertaron en el extremo 5' del gen que codifica para la CTB. El gen quimérico se empleó para transformar *E. coli* y la cuantificación de CTB en el medio de cultivo se realizó por la técnica de GM1-ELISA. Las proteínas de fusión se identificaron por el cambio en su peso molecular en comparación con la CTB nativa. Estas proteínas de fusión permitieron la selección eficiente de clones positivas mediante GM1-ELISA. Los anticuerpos policlonales y los monoclonales reconocieron tanto a la porina nativa, como a la bacteria completa. Estos resultados demuestran que estas regiones están expuestas en la superficie y que pueden corresponder a las asas 6 y 7. La observación de que fueron

accesibles a los anticuerpos sugiere que pueden estar involucrados en los mecanismos de inducción de protección por la inmunización con porinas.

## ABSTRACT

Porins are the most abundant proteins on the membrane of Gram negative bacteria. They are transmembrane proteins which function as passive diffusion channels for low molecular weight molecules. In a murine model, it has been shown that Omp C from *Salmonella typhi* plays a role in the protective immunity against the challenge with this bacteria. In order to identify B-cell epitopes, specific for *S. typhi* only, the *Escherichia coli* and *S. typhi* OmpC sequences were aligned. The 246-255 and 285-303 aminoacid strands in the *S. typhi* OmpC sequence were supposed to correspond to the extracellular loops 6 and 7. According to the crystallographic model of *E. coli* Omp F, loops 6 and 7 are projected extracellularly. In order to probe this assumption, peptides bearing these sequences were generated by solid phase synthesis and mice were immunized independently with both peptides. These mice raised antibodies which recognized both, the native OmpC porin and the whole *S. typhi* 9,12,Vi:d. These results demonstrate that these regions are indeed surface-exposed and may very well correspond to loops 6 and 7. In another side, mice were immunized with resin-bound peptides whose sequences have been proposed to be part of exposed loops in *S. typhi* outer membrane protein OmpC. To screen hybridomas for monoclonal antibodies against those epitopes we designed fusion proteins where the candidate peptide sequence was attached to the amino end of cholera toxin B-subunit (CTB). The constructed fusion proteins allowed the efficient selection of positive clones by GM1-ELISA. Selected antibodies recognized purified OmpC and whole *Salmonella* bacteria. This suggests a native structure of our genetically attached peptides in agreement with immunological properties reported for previous CTB recombinant fusion proteins. In a more general context CTB hybrids could be used to screen for antibodies towards immunogenic epitopes in other systems. This might turn particularly useful when producing antibodies against peptide sequences in microorganisms whose handling is difficult or that pose inherent health risks. Moreover, the observation that the loops were accessible to antibodies suggest that they may be involved in protective mechanisms elicited by the immunization with porins.

## INDICE

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Generalidades</b>	<b>3</b>
1.1 Reconocimiento antigénico	3
1.2 Péptidos sintéticos como inmunógenos	6
1.3 Epitopos	6
1.4 Métodos de predicción de epitopos	8
1.5 Péptidos sintéticos	10
2.1 Las porinas	12
2.2 Predicción de epitopos	19
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>22</b>
<b>Resultados</b>	<b>39</b>
<b>Discusión</b>	<b>59</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>72</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>73</b>

## INTRODUCCION

Las proteínas que se encuentran insertadas en la membrana tienen segmentos hidrofóbicos que interaccionan con los fosfolípidos de la misma, esta interacción permite el anclaje de dichas moléculas debido al número de veces que atraviezan la membrana originando a su vez que se expongan ciertas regiones hacia el exterior de la bicapa lipídica.

La membrana de las bacterias Gram-negativas las protege del medio externo, pero a su vez debe permitir un intercambio de solutos y solventes necesarios para el microorganismo. Las porinas, proteínas de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, se asocian en trímeros y tienen un peso molecular promedio entre 38 y 42 KDa. Son proteínas que cumplen esta función ya que forman canales de difusión facilitada con un límite de exclusión de aproximadamente 600 daltons.<sup>1</sup>

Por sus características hidrofóbicas, tienden a agregarse en solución acuosa y es muy difícil solubilizarlas, por lo tanto la determinación de su estructura cristalográfica es compleja; sin embargo la descripción de las estructuras de una porina de *Rhodobacter capsulatus*<sup>2</sup> y de las porinas PhoE y Omp F de *Escherichia coli*<sup>3</sup>, permite saber que estas proteínas tienen una conformación de 16  $\beta$ -plegadas antiparalelas, con 7 loops cortos (de 2 a 5 residuos de aminoácidos) hacia la parte interna y 8 loops largos (5 a 44 residuos, 14 en promedio) expuestos hacia la superficie de la bacteria.

Debido a las dificultades que presenta su cristalización, cada vez se utilizan con más frecuencia los algoritmos de predicción<sup>4</sup> para obtener modelos estructurales de las proteínas de membrana,<sup>5</sup> en combinación con otros métodos y otras estrategias para comprobar la eficacia de los mismos.<sup>6</sup>

Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos descrito la importancia de estas proteínas en la inducción de protección, en ratones, contra el reto de la bacteria completa,<sup>7 8 9</sup> así como su importancia en la inducción de los mecanismos de la respuesta inmune en los humanos.<sup>10 11</sup> Y últimamente, la participación de la porina Omp C de *Salmonella typhi* en la inducción de protección en el modelo murino.<sup>12</sup>

Esta tesis tiene como finalidad identificar epitopos de la porina que sean reconocidos por anticuerpos, mediante la predicción de los mismos y su posterior análisis inmunológico.

Considerando la alta homología que existe entre las porinas de las bacterias gram-negativas<sup>13</sup>, en este trabajo, se tomó la secuencia de la porina Omp C de *Salmonella typhi*<sup>14</sup> y se realizó la predicción de regiones expuestas de la misma. Posteriormente se alineó con la secuencia de la porina Omp C de *Escherichia coli*<sup>15</sup>, y se eligieron dos regiones no compartidas, es decir *Salmonella*-específicas. Estas secuencias se sintetizaron químicamente y se evaluó la capacidad antigénica del péptido empleando conjugados químicos y genéticos. Se generaron anticuerpos policlonales y monoclonales contra las regiones escogidas y éstos fueron capaces de reconocer tanto a la porina nativa como a la bacteria completa. Estos resultados nos ha permitido (Martín-Orozco, N., manuscrito en preparación) proponer un modelo de la topología de dicha proteína y confirmar que estas secuencias corresponden a la asas 6 y 7 y que se encuentran expuestas en la porina y sobre la superficie de la bacteria.

Además, esto permite confirmar que los anticuerpos alcanzan la superficie de la bacteria y permite corroborar el mecanismo de eliminación de la misma, propuesto por Ortiz y cols., mediado por complemento y por facilitación de la fagocitosis al opsonizar a la misma.



## GENERALIDADES.

### **1.1 Reconocimiento antigénico.**

El anticuerpo (Ac) y el receptor para el antígeno del linfocito T (TCR) tienen muchas características similares. Ambos poseen dominios variables y constantes, y tienen procesos de recombinación genética semejantes. Sin embargo, la forma mediante la cual el linfocito B y el linfocito T reconocen al antígeno son ligeramente diferentes. El anticuerpo reconoce antígenos solubles o sobre superficies celulares, pero siempre en su conformación nativa, mientras que el receptor de T solamente reconoce al antígeno asociado con las moléculas de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA). Dichos antígenos son procesados y/o degradados de tal manera que el determinante antigénico reconocido por el TCR es solamente un fragmento pequeño del antígeno original.

Otra diferencia importante, es que el anticuerpo puede ser producido en dos formas, como el receptor para el antígeno de la célula B o como anticuerpo secretado, mientras que el TCR siempre es una proteína membranal integral. El anticuerpo secretado es una molécula bifuncional, en donde las regiones variables se enlazan al antígeno y los dominios constantes interactúan con receptores sobre las células de tejidos o con el complemento.

### Linfocitos T.

La inmunología molecular, tuvo un gran avance a finales de los 80's con la descripción de la estructura cristalográfica de la molécula de histocompatibilidad clase I<sup>16</sup>. Dichos estudios, condujeron directamente al concepto de que el reconocimiento del antígeno por células T, podría ser imitado por la adición de péptidos derivados del antígeno proteico intacto. Aunque estas observaciones son congruentes con la forma en que los antígenos son reconocidos por estas moléculas, las vías intracelulares de generación de estos péptidos son totalmente diferentes la una de la otra. Los péptidos destinados a asociarse con moléculas clase I, se generan de proteínas sintetizadas o introducidas directamente al citoplasma de la célula, mientras que los péptidos que se asocian a moléculas clase II son producidos en un compartimento endosomal o lisosomal<sup>17</sup>.

Lineas celulares con mutaciones en genes que afectan una u otra de las vías fueron identificadas<sup>18 19</sup>. La observación de que la expresión en la superficie celular o la conformación de la molécula está modificada, en estas mutantes, indica que aun en células no infectadas, la gran mayoría de las moléculas de MHC tienen péptidos enlazados a ellas, presumiblemente derivados de la degradación de proteínas celulares normales o de material endocitado.

La interacción de la molécula del MHC con el péptido fue visto con una perspectiva diferente, debido al análisis de la unión MHC-péptido que realizó Rammensee y cols<sup>20</sup>. Ellos describieron que las secuencias reconocidas contenían motivos (*motifs*=secuencias de aminoácidos que se repiten) que eran alelo-específicas. Estas secuencias fueron

descritas de proteínas procesadas naturalmente. En el caso de las moléculas clase I, estos *motifs*, han tenido un valor predictivo para identificar epitopos para linfocitos T CD8+. Estos resultados sobre la secuencia de los péptidos junto con los datos estructurales han provisto de una referencia muy fuerte para el estudio y el entendimiento del anclaje de los péptidos al nicho de la molécula de histocompatibilidad.

### Linfocitos B.

En la reacción antígeno-anticuerpo, la molécula de anticuerpo no reconoce a todo el antígeno a través de su sitio de unión. La porción del antígeno que es el blanco de la unión del anticuerpo se conoce como determinante antigénico y pueden haber más de un determinante antigénico por molécula. Para estudiar la especificidad del anticuerpo, se necesita tener anticuerpos dirigidos contra un solo determinante antigénico. Los haptenos son grupos funcionales que corresponden a un solo determinante antigénico, por ejemplo; pueden ser compuestos orgánicos como el trinitrofenol (TNP) o bencenarzonato, mono u oligosacáridos tales como la glucosa o la lactosa o un oligopéptido como la pentalisina.

Los determinantes antigénicos de las proteínas consisten de residuos de aminoácidos en un arreglo tridimensional determinado. Los residuos que hacen contacto con la parte complementaria en la molécula de anticuerpo se conocen como residuos de contacto. Obviamente, para que hagan contacto estos residuos deben estar expuestos en la superficie de la proteína y no ocultos en la parte hidrofóbica.

### **1.2 Péptidos sintéticos como inmunógenos.**

Históricamente, los péptidos sintéticos han sido utilizados desde los años 60's, mas que nada como reactivos de investigación. La disponibilidad de estos péptidos sintéticos permitió un estudio sistemático de los parámetros de la antigenicidad <sup>21</sup>.

Sin embargo, para el caso de los linfocitos T, la presentación del antígeno necesita de un reconocimiento dual (péptido y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad), por lo que nos enfrentamos a problemas difíciles de resolver <sup>22</sup>.

Para sintetizar un péptido determinado, es útil predecir las regiones de la proteína que serían reconocidas por el sistema inmune. Esto es complicado por el hecho de que además de los factores intrínsecos relacionados con la estructura del antígeno o la secuencia del mismo (motifs), muchos factores extrínsecos, relacionados con la regulación y el repertorio del sistema inmune, determinan qué sitios de una proteína son de hecho, reconocidas por linfocitos T y B <sup>21</sup>.

### **1.3 Epitopos.**

La antigenicidad de una proteína reside en una parte restringida de la molécula conocida como determinante antigénico o epitopo. Esta región está accesible en la superficie de la molécula y es reconocida por los paratopes o sitios de unión específicos de una molécula de anticuerpo. Los paratopes están presentes en los extremos de cada uno de los dos Fab de los anticuerpos y consisten en rizados hipervariables de residuos que hacen unión con el antígeno <sup>23</sup>.

Los tipos de epitopos se han clasificado en función de su unión con el paratope en <sup>24</sup>.

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

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

En cuanto al número de epitopos que puede haber en una proteína podemos comentar que:

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

2.- Toda la superficie accesible de la molécula es un conjunto de epitopos que se traslapan, potencialmente capaces de unirse con su apropiado paratope. El que un epitopo sea capaz de provocar una respuesta de anticuerpos en un individuo dependerá de factores genéticos de éste como son el repertorio genético de inmunoglobulinas, la tolerancia y otros mecanismos reguladores <sup>25</sup>.

En proteínas globulares generalmente los residuos terminales son predominantemente superficiales lo que explica porqué los extremos amino y carboxilo poseen antigenicidad.

Generalmente los epitopos de B corresponden a secuencias discontinuas. Datos estructurales cristalográficos establecen que los epitopos en las proteínas nativas

consisten en 15 a 22 residuos en un arreglo discontinuo. Sin embargo, cálculos energéticos sugieren que es un péptido de 5 a 6 aminoácidos el que contribuye con la más alta energía de unión al complejo antígeno-anticuerpo, y los demás residuos sólo contribuyen a la complementaridad <sup>26</sup>.

El estudio a futuro de las estructuras de los epitopos debe considerar su estructura nativa así como las interacciones con el anticuerpo. El análisis cristalográfico de un péptido de 19 aminoácidos proveniente de la miohemeritina muestra una configuración de hoja plegada en el nicho del anticuerpo y en forma nativa corresponde a una región de alfa hélice <sup>27</sup>.

#### **1.4 Métodos de predicción de epitopos**

##### **1.4.1 Algoritmos de predicción.**

Los algoritmos de predicción se han utilizado principalmente para dilucidar la estructura secundaria y terciaria de proteínas partiendo de su secuencia de aminoácidos. Estos han tenido cierto éxito para las proteínas globulares cuya base de datos cristalográficos es muy rica. Sin embargo en proteínas transmembranales esto se ha visto limitado debido a que muy pocas proteínas transmembranales han sido cristalizadas y analizadas por difracción de rayos X <sup>28</sup>.

Para la búsqueda de cualquier estructura en una proteína, hélices, hojas plegadas, o en nuestro caso sitios antigénicos, se deben conocer las funciones y objetivos de los

algoritmos y a la par considerar los datos experimentales y características de la secuencia en estudio. Esto nos permitirá elegir el método adecuado aplicable al caso de predicción<sup>29</sup>.

#### 1.4.2 Predicción de epitopos de B.

Los determinantes antigénicos reconocidos por linfocitos B son regiones generalmente expuestas al medio acuoso. Poseen principalmente aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas y cargadas. La predicción de epitopos de B esta basada en estas características.

##### 1.4.2.1. Método de Hoop y Woods

El método de Hoop y Woods<sup>30</sup> localiza determinantes antigénicos reconocidos por linfocitos B en una proteína, analizando promedios de hidrofiliidad de los aminoácidos. Encuentra el punto de mayor hidrofiliidad que corresponde o está adyacente a un sitio antigénico.

##### 1.4.2.2. Método de Karplus y Shultz

El método propuesto por Karplus y Shulz plantea que la movilidad de los segmentos a lo largo de una cadena polipeptídica esta correlacionada con la localización de los epítapos continuos en una proteína<sup>31</sup>.

La localización de un epitopo en una región móvil es ventajosa debido a que facilita, para el epitopo, ajustarse a un paratope preexistente y esto permite encontrar su pareja de anticuerpo que le ajuste. La movilidad puede mejorar la complementariedad de las regiones de contacto por un fenómeno de ajuste.

La información acerca de la movilidad en proteínas proviene de estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) y estudios cristalográficos, con parámetros sobre movimientos rápidos de las cadenas laterales. Estos métodos proveen los factores de temperatura atómica (valores B o Debye-Waller) que representan el desplegado de los mínimos cuadrados de cada átomo de un promedio bien determinado de posiciones (desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio de posiciones.)

### **1.5 Péptidos sintéticos.**

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

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



Es importante señalar la diferencia entre antigenicidad e inmunogenicidad de un péptido. La antigenicidad se refiere a la habilidad de una proteína o un péptido de unirse específicamente a un anticuerpo incluso en condiciones *in vitro*, mientras que la inmunogenicidad se refiere a la capacidad del antígeno de provocar una respuesta de anticuerpos. La primera es una característica intrínseca del péptido mientras que la segunda depende de las funciones de linfocitos B y T cooperadores, del protocolo de inmunización, de la naturaleza de las interacciones entre linfocitos T y B, de la genética del animal inmunizado y de otras características extrínsecas. Los estudios de péptidos sintéticos conjugados con proteínas heterólogas buscan antigenicidad con respecto a las células B, más no inmunogenicidad.

Los péptidos sintéticos pueden provocar una respuesta de anticuerpos que reconozcan tanto al péptido como a la proteína nativa. Se ha observado que anticuerpos monoclonales anti la proteína nativa no reconocen a los péptidos <sup>21</sup>.

Antipéptidos se han utilizado para detectar cambios conformacionales en proteínas y para la purificación de proteínas clonadas y/o fusionadas con el péptido en su extremo carboxilo o amino.

Milich clasificó operativamente a los anticuerpos antipéptidos en: <sup>21</sup>

a) Antipéptidos que reaccionan con el péptido inmunógeno mas no con la proteína nativa (péptidos específicos).

b) Antipéptidos que reaccionan con el péptido inmunógeno y con la proteína nativa, pero que no compiten con los anticuerpos producidos por la inmunización con la proteína nativa (péptidos unicos).

c) Antipéptidos que reaccionan con el péptido inmunógeno y con la proteína nativa y que compiten con anticuerpos producidos inmunizando con la proteína nativa (determinantes secuenciales específicos).

## **2.1 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 38,000-42,000 Da, se ensamblan como trímeros y forman poros o canales que permiten la difusión inespecífica de pequeñas moléculas hidrofílicas al interior de la bacteria <sup>32</sup>.

Las porinas identificadas en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* son Omp C, Omp F y Pho E, presentes en ambas cepas, y Omp D, presente exclusivamente en *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

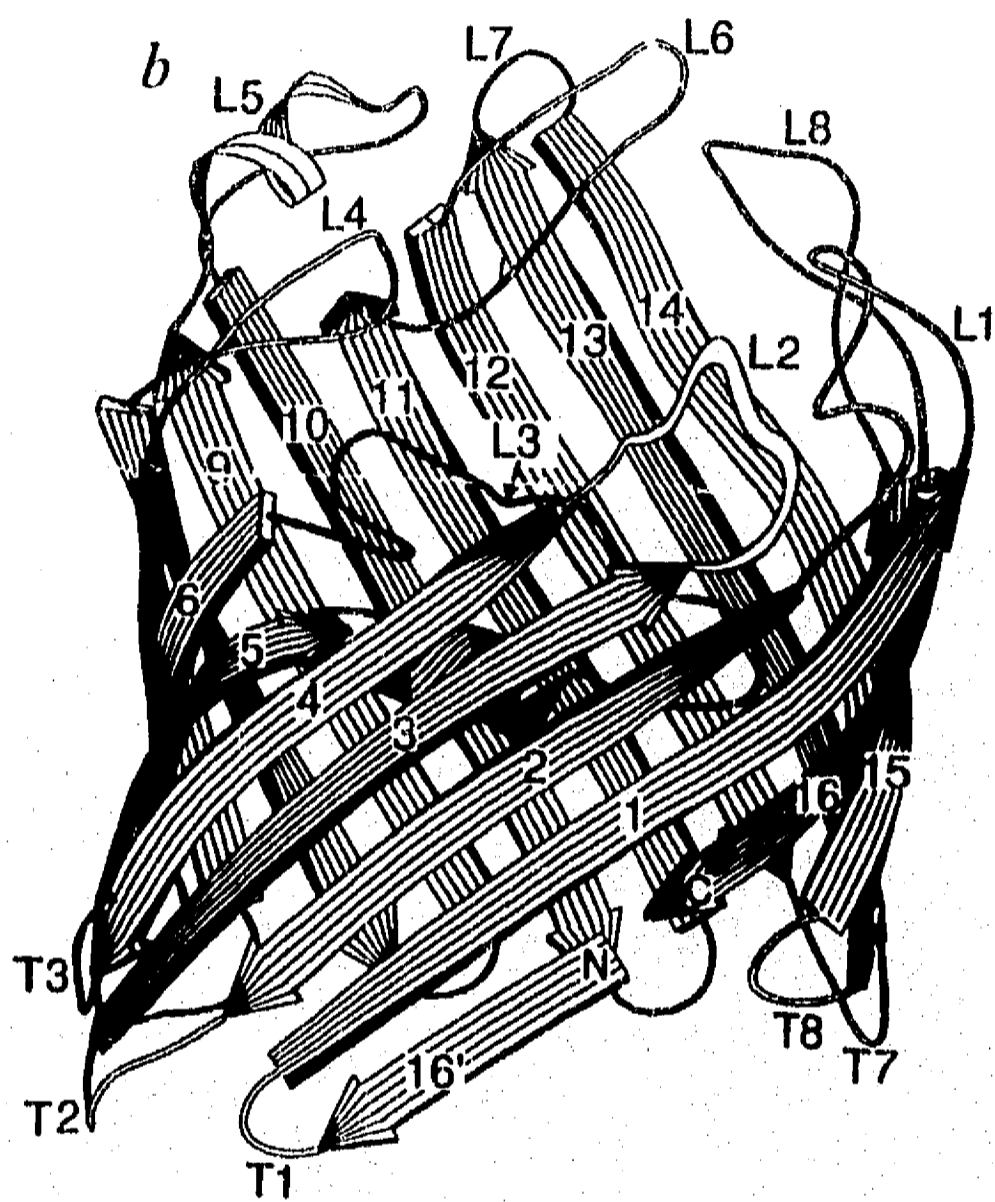
gran estabilidad en presencia de detergentes como las sales biliares y el SDS, y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas<sup>32 33</sup>.

### **2.1.1 Estructura de las porinas.**

#### **2.1.1.1 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 (Figura 1). La entrada del poro la delimitan largas prolongaciones del cilindro que, al inclinarse hacia el centro del canal, restringen su acceso. 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<sup>3</sup>.

El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio. Los estudios cristalográficos realizados en OmpF y PhoE, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril  $\beta$  formado por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por largas asas con algunas  $\alpha$ -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras  $\beta$  de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja  $\beta$ -16 y el extremo amino de la hoja  $\beta$ -1<sup>3</sup>.



**Figura 1. Modelo tridimensional de la porina OmpF de *E. coli*. Estructura definida por cristalografía de rayos X a una definición de 2.5 Å. Tomado de Rosenbouch (3).**

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, el cual está rodeado por dos "cinturones" de aminoácidos aromáticos que por su interacción con la membrana le permiten, a la porina, anclarse a la misma<sup>6</sup>. La entrada del poro está restringida por las asas largas y disparejas 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  $\beta$ . El mayor número de modificaciones en la secuencia protéica 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<sup>3</sup>. Esta proteína comparte muchas propiedades estructurales y funcionales con otras porinas, pero no así la homología de sus secuencias.

#### 2.1.1.2 El trímero.

Los monómeros de las porinas se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa formando trímeros<sup>34</sup>. Contrariamente a lo que antes se creía, los canales no se fusionan dentro del mismo trímero; sino que están bien separados por una distancia de »35 Å<sup>3</sup>.

La principal contribución a la formación del trímero es el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas  $\beta$  1-5 y  $\beta$  16, donde los diez residuos carboxilo de la región  $\beta$  16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y la estabilidad de la porina<sup>35 36</sup>.

### 2.1.1.3 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. Hasta el momento las porinas más estudiadas son las de *E. coli* y *S. typhimurium*.<sup>33</sup>

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 sales<sup>32</sup>.

OmpC y OmpF son proteínas muy semejantes funcional y estructuralmente; sus poros tienen tamaños de exclusión similares ( $M_r \gg 600$  dal), y diámetros que varían entre 1.1 y 1.3 nm<sup>32</sup>. 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<sup>37</sup>. 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 que 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 <sup>32</sup>.

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 <sup>34</sup>.

### **2.1.2 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.

Se ha demostrado que estas proteínas estimulan mecanismos efectores humorales y celulares en el modelo murino y que son buenos inmunógenos para la inducción de un estado de protección contra la infección por la bacteria <sup>789</sup>.

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 <sup>7</sup>.

Más adelante la inmunización con cantidades tan pequeñas como 10 mg de porinas purificadas de *Salmonella typhi*, confirió protección al 90% de los ratones NIH retados con

500 DL<sub>50</sub> 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 <sup>8</sup>.

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<sub>50</sub> en el modelo murino<sup>38</sup> mientras que los anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido no indujeron protección<sup>39</sup>.

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 <sup>10</sup>. De igual modo, la administración de la vacuna antitifoídica oral indujo la producción de anticuerpos anti-porinas en las personas estudiadas <sup>11</sup>.

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 <sup>9</sup>.

La porina OmpC recombinante es capaz de inducir una protección del 30% al reto con 100 DL<sub>50</sub> de la bacteria viva <sup>12</sup>.



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.

## **2.2 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, definida por secuencias específicas dentro de las cuales se identifican ciertos aminoácidos de anclaje al nicho de la molécula de histocompatibilidad, en función del haplotipo del que se trate <sup>40</sup>.

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 <sup>41 42</sup>.

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 <sup>43</sup>.

Una estrategia para el mapeo de los epitopos puede ser la de sintetizar varios péptidos con secuencias traslapadas que en total abarquen toda la secuencia 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, que permiten establecer predicciones de las regiones de la proteína que puedan ser antigénicas.

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 de computadora.

El programa del paquete **PCGENE**, denominado **FLEXPRO** <sup>24 28 29</sup>, basa sus predicciones en el modelo de flexibilidad o movilidad de las regiones antigénicas, 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 térmica <sup>44</sup> (valores de Debye-Waller), que representan el desplazamiento mínimo de cada átomo en un promedio determinado de posiciones. Tomando en cuenta el factor Debye-

Waller para el carbono-a de los aminoácidos, el algoritmo selecciona aquellas regiones que, a lo largo de la secuencia, muestran los valores de movilidad más elevados.

Los métodos para predecir epitopos, 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<sup>45</sup>.

En este trabajo se reporta la identificación de dos regiones expuestas de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, mediante un mapeo con anticuerpos, para el que se utilizaron tanto péptidos sintéticos como proteínas híbridas, las cuales contienen al péptido predicho.

## MATERIALES Y METODOS.

### **- Cepas bacterianas y medios de cultivo.**

La cepa virulenta *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d se aisló originalmente de un paciente con fiebre tifoidea y desde entonces se ha mantenido en nuestro laboratorio. Se crece en medio mínimo "A", conteniendo 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. La cepa *Escherichia coli* UH302/psT13, expresa únicamente la porina OmpC recombinante de *Salmonella typhi* (rOmpC) y fue gentilmente donada por el Dr. Felipe Cabello (New York Medical College) <sup>46</sup> y se creció en medio mínimo "A" suplementado con 50µg/ml de ampicilina. La cepa *Escherichia coli* K12 fue donada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, de la Secretaría de Salud, México, D.F.

### **- Aislamiento de la porina OmpC recombinante de *Salmonella typhi*.**

La porina rOmpC de *S. typhi* se aisló de la cepa *E. coli* UH302/psT13, mediante una modificación del método descrito por Nikaido <sup>33</sup> y descrito con anterioridad <sup>8</sup>.

### **- Predicción de los sitios antigénicos de la porina OmpC de *Salmonella typhi*.**

Se buscaron epitopos mediante algoritmos de predicción en la secuencia de la porina OmpC de *Salmonella typhi* 9,12 Vi:d de 378 aminoácidos reportada por Calva y cols <sup>14</sup>, y las predicciones de epitopos de B se realizaron con el programa FLEXPPO (versión 2.03. 1989) del paquete PCGENE, (PCGENE: the nucleic acid and protein sequence analysis software system. (C) A. Bairoch/ University of Geneva/ Switzerland;

(T.M) Intelligenetics Inc. Release 6.26/ 1990). Los programas **ANTIGEN** y **FLEXP**RO se utilizaron para predecir epitopos, **PALING** para el alineamiento de las secuencias y **QGSEARCH** para identificar la presencia de secuencias repetidas en otras regiones de la proteína.

El programa **FLEXP**RO basado en el modelo de flexibilidad o movilidad de los antígenos reportado por Karpluz y Shulz toma como medida de flexibilidad los factores de temperatura atómica (valores B o factores Debye-Waller) con respecto al carbono alfa. Los valores B representan el mínimo cuadrado del desplazamiento de cada átomo en una posición promedio <sup>44</sup>.

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

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

Reporta el perfil de movilidad como los valores de B a lo largo de la secuencia y los 10 valores de B más altos como posibles regiones antigénicas. Se realizó el análisis con ventanas de 6 aminoácidos.

Las secuencias identificadas por éste método fueron comparadas a las obtenidas por otros métodos (ANTIGEN), basados en la hidrofiliidad de la secuencia.

#### **- Síntesis de péptidos.**

##### Péptidos sintéticos solubles.

La síntesis, del péptido 246-255 (GTSNGSNPST), se realizó sobre un soporte sólido de polidimetilacrilamida Novasyn KA, empleando la técnica de derivados Fmoc y el desprendimiento con ácido trifluoroacético. La purificación de los péptidos sintéticos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando una columna C-18 (m-Bondapak 125 A.10 mm 7.8 x 300 mm) y un flujo de 2.5 ml/min <sup>47</sup>.

El péptido 286-303 (LQSKGKDISNGYGASYGDQ) se sintetizó empleando la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida, con la química de los derivados F-moc en poliamida, <sup>48 49 50</sup> 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).

##### Péptidos sintéticos unidos a resina.

Se acoplaron los péptidos (GTSNGSNPST y LQSKGKDISNGYGASYGDQ) a una resina de síntesis en fase sólida (0.25 mmol), utilizando un sintetizador semiautomático (Novabiochem, CA, USA). Para lo cual se usó una resina comercial básica Novasyn KD y se empleó la química de derivados F-moc (15 y 16 del IID). La desprotección de los grupos

laterales sin desprender el péptido de la resina, fue posible gracias a la alta resistencia de la unión benzyl-éster al TFA.<sup>51</sup>

#### **- Conjugación a proteínas acarreadoras.**

##### Unión química.

El péptido sintético, 286-303, se conjugó empleando el método de carbodiimidias, a tres acarreadores diferentes: albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina (KLH) y lisozima; para lo cual se empleó un kit de conjugación *Imject<sup>®</sup> immunogen EDC Conjugation Kit with BSA and KLH* (No. 77101 G) de **Pierce**. Este método se basa en la activación de grupos carboxilos por el hidrocloreuro de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), y su posterior reacción con aminos primarias.

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

##### Esquemas de inmunización.

- Los conjugados químicos 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 mg del conjugado BSA-péptido en adyuvante completo de Freund por cada ratón

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

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

- El conjugado peptidil-resina se resuspendió en agua desionizada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, dicha preparación se sonicó (Soniprep 150) hasta que se formó una emulsión homogénea. Se administraron inyecciones intraperitoneales, a grupos de 5 ratones cada uno de la cepa C3H/FeJ, con el siguiente esquema:

**Día 1:** Dosis de 0.5 mg de peptidil-resina, que corresponde aproximadamente 10 µg del péptido.

**Día 15:** Refuerzo con una dosis igual a la anterior.

**Día 21:** Sangrado de los ratones y obtención de los sueros de manera individual.

#### Evaluación inmunoquímica de los sueros de ratón.

##### *a.- Titulación de los sueros.*

Los sueros se titularon mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA),<sup>52</sup> 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.



*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<sup>6</sup>. 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 el 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.

**- Obtención de anticuerpos policlonales anti-péptido.**

Preparación del inmunógeno.

Los péptidos sintetizados y unidos a la resina KD, se resuspendieron en agua destilada y desionizada, adicionado de adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente, la preparación se homogenizó en un sonicador "Soniprep 150", en intervalos de un minuto hasta que la mezcla tomó un aspecto lechoso.

### Esquema de inmunización.

Ratones con un peso promedio de 14 a 16 g fueron inmunizados dos veces con 0.5 mg de la mezcla péptido-resina (aproximadamente 10 ug de péptido), con intervalos de 15 días. Siete días después, se sangraron por punción retroorbital y el título de anticuerpos se evaluó mediante la técnica de ELISA, empleando como antígeno a la porina Omp C recombinante. Cada vez que se requirió más suero, los ratones se reforzaron y se sangraron 4 días después de la última inmunización.

### **- Proteínas híbridas PAP-CTB.**

#### Diseño de los oligonucleótidos.

Las secuencias nucleotídicas elegidas fué elaborada *ad hoc* para este trabajo y fue diseñada como dos cadenas sencillas complementarias, que al ser apareadas *in vitro* dejan dos extremos libres de cadena sencilla, los cuales a su vez son complementarios a los extremos generados después de digerir con las enzimas Sac I y Xma I. La secuencia insertada, del péptido 246-255, incluye un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Kpn I y al regenerarse el plásmido no se reconstituye el sitio de Sac I. Los oligonucleótidos fueron elaborados en la Unidad de Síntesis del Departamento de Inmunología de la Universidad de Uppsala, Suecia y en la compañía Oligos, Etc. En la elección de los tripletes se tomó en cuenta el uso preferencial de codones empleado por *E. coli*.

### Construcción genética.

Se empleó el plásmido pJS 752-3<sup>53</sup> (Figura 2) el cual contiene el gen de la subunidad B de la toxina del cólera (1202 pb) controlada por el promotor *lac*. En el extremo codificante para el amino terminal (5') existe un sitio de corte para la enzima Sac I y otro para la enzima Xma I.

El plásmido fué purificado por métodos convencionales<sup>54</sup> y digerido con la enzima Xma I (New England, Biolabs). Después de verificar la totalidad de la digestión, el vector fué extraído con fenol-cloroformo y precipitado con etanol. Este ADN fué digerido con la enzima Sac I y repurificado. Al plásmido lineal se le agregó un exceso molar de oligonucleótidos (50:1) y se circularizó con DNA ligasa de T4 (Gibco, BRL), por 16 hrs a 15°C.

Este ADN fué empleado para transformar células competentes DH5a (ver abajo). Las colonias recombinantes obtenidas fueron identificadas mediante la purificación de plásmido en pequeña escala, su digestión con las enzimas KpnI junto con HindIII y la visualización en electroforesis de las bandas de 1.2 Kb (inserto) y de 4.7 Kb (vector).

### Electroforesis de agarosa.

Para el análisis de las moléculas de DNA se emplearon geles de agarosa al 1 y 2% y un sistema de buffer de Tris-Boratos-EDTA<sup>54</sup>. El corrimiento se llevó a cabo aproximadamente durante 15 minutos y a 75 Voltios, después se tiñó el gel con Bromuro de etidio (0.5 mg/ml en agua), para continuar el corrimiento hasta que la separación de las

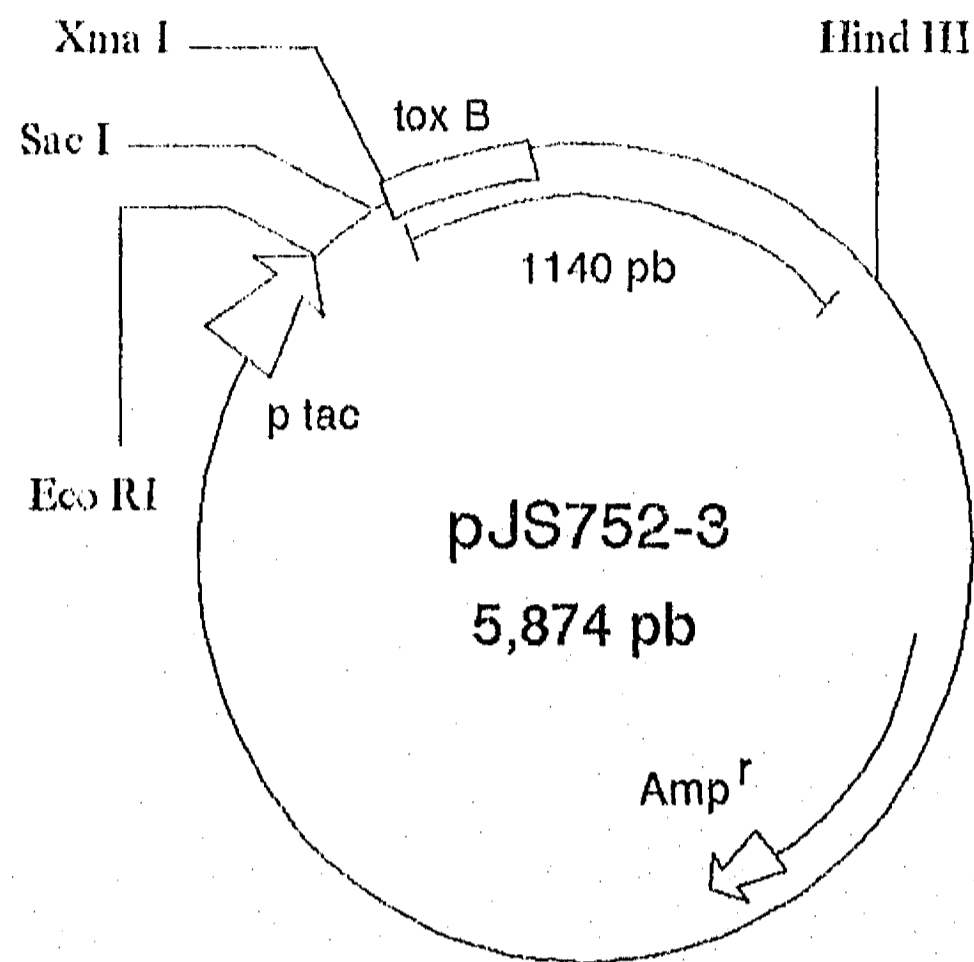


Figura 2. Mapa del plásmido pJS752-3. La proteína CTB está codificada por el gen *tox B* y éste se encuentra fuertemente regulado por el promotor *tacP*. Se muestran los sitios de restricción y se indica la resistencia a ampicilina.

bandas era adecuada. En la observación de los geles se utilizó Luz ultravioleta larga (366 nm) y se documentaron mediante fotografía empleando una cámara Polaroid MP-4, filtro Wratten 22 y película Polaroid 667.

#### Transformación de células competentes.

Las células competentes que se emplearon fueron *E. coli* 5 $\alpha$  (Gibco, BRL) preparadas por un método modificado de Hanahan<sup>55</sup>. Las modificaciones consistieron en la omisión de hexamina cobalto, DTT y DMSO al buffer FSB. La transformación se realizó siguiendo el método de Hanahan.

#### Producción de las proteínas híbridas.

Las colonias recombinantes se crecieron en medio Luria, con ampicilina 0.2 mg/ml<sup>54</sup> hasta la fase estacionaria tardía (16-18 hrs) y se cosecharon a 6 000 x g, colectándose tanto la pastilla celular como el sobrenadante.

#### Obtención de CTB y de PAP-CTB por precipitación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El sobrenadante del cultivo fué recuperado, se midió su volumen y se le agregó sulfato de amonio hasta el 70% de saturación. Se agitó hasta disolverse y se mantuvo a 4°C por 16 horas con agitación. El precipitado se colectó a 13,000 x g por 20 minutos. Se resuspendió en un centésimo del volumen inicial de PBS.

### Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La SDS-PAGE de la subunidad B nativa y recombinante se hizo en una unidad electroforética para geles verticales en placa (Gibco, BRL) en condiciones reductoras y sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo al método de Laemmli<sup>56</sup>. Como amortiguador de muestra se usó Tris 0.125 M pH 6.8, que contenía SDS al 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005 %. El gel superior contenía 5 % de acrilamida, 0.13 % de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel separador contenía 15.0 % de acrilamida, 2.5 % de bis-acrilamida, 0.19 % de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante aproximadamente 2 h, empleando 30 mA por placa y como amortiguador de corrimiento Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1 %, pH 8.3. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 1 h en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel estaba transparente.

### Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (GM1-ELISA).

Para determinar la presencia de la subunidad B de la toxina del cólera en el sobrenadante de cultivo de la bacteria recombinante se empleó el método de ELISA, como se describe brevemente<sup>57</sup>.

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (Corning), con 100 ml/pozo de una solución de 1.5 mM de gangliósido GM<sub>1</sub> en PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.236 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.180 g/l, NaCl 8.5 g/l) y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Las placas se lavaron con PBS tres veces; posteriormente se bloquearon con albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma, Co) al 0.1% en PBS utilizando 200 ml/pozo e incubándolas a 37°C durante 30 min. Al terminar la incubación se lavaron 3 veces con PBS.

El sobrenadante a investigar se agregó en la dilución correspondiente y como control positivo se empleó subunidad B recombinante a una concentración de 1 mg/ml a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas 1:2. Se incubó 1 hr a temperatura ambiente, se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T). En seguida, se agregó el anticuerpo monoclonal LT39, que reconoce a la subunidad B en su forma pentamérica, diluido 1:100 en PBS-ASB 0.1%. Se incubó 1 hr a temperatura ambiente. El lavado se hizo tres veces con PBS-T. El conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón se agregó en dilución 1:1000 y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se lavó tres veces con PBS-T. En seguida, se agregó el sustrato (OPD 10 mg/dl, buffer de citratos 0.1 M pH 4.5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% 4 ml). Se dejó desarrollar el color durante aproximadamente 10 minutos y se leyó en un lector para ELISA a 490 nm.

#### Identificación inmunológica del Péptido.

Con el mismo sistema de GM<sub>1</sub>-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.

### **- Análisis de regiones expuestas de la porina Omp C.**

Para averiguar si las regiones predichas están expuestas en la porina y en la superficie de la bacteria intacta, se realizaron dos tipos de ensayos:

#### Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Los sueros se titularon mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA),<sup>52</sup> según se describe brevemente a continuación. Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Nunc Co), con 1 µg/pozo de la proteína nativa (Omp C) 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.

#### Citometría de flujo (FACS).

Para analizar la exposición de estas regiones sobre la superficie de la bacteria, se realizaron ensayos de citometría de flujo con los anticuerpos policlonales. Se describe brevemente: La bacteria (*Salmonella typhi* 9,12,Vi,d) se creció durante toda la noche a 37°C, se lavó 3 veces con PBS-SNC al 2% (esterilizado por filtración), se incubó 3 hrs. a 37°C con el anticuerpo anti-péptido, después de lavada se le agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) [Gibco, BRL], en dilución 1:100, y a continuación se lavó para eliminar el exceso de anticuerpo, para posteriormente,



resuspender el paquete bacteriano en PBS-SNC al 2% con bromuro de propidio 1:1000 y efectuar la lectura de fluorescencia en el citómetro de flujo (FACScan de Beckton Dickinson), utilizando el software Lysys II. Las ventanas de adquisición se ajustaron a un "forward scatter" y "side scatter" de tal manera de que se excluyeran las células lizadas y los agregados celulares. Se analizaron 10,000 células en cada muestra.

**- Obtención de anticuerpos monoclonales contra regiones expuestas de la porina Omp C de *Salmonella typhi*.**

Obtención de células alimentadoras (macrófagos de cavidad peritoneal).

Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c, en condiciones de esterilidad. Los macrófagos así obtenidos se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DME) (Sigma) o en medio RPMI-1640, suplementado con 10 al 20 % de suero fetal bovino (Gibco, BRL), glutamina 2 mM, glicina 0.3 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM, estreptomicina 100 mg/ml y penicilina 100 U.I./ml (DME-S). 50 ml de la suspensión de macrófagos, se colocaron en las placas de cultivo de 96 pozos (Nunc, Co.) y se mantuvieron en un incubadora a 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso.

Linea celular de mieloma.

Se emplearon células de la línea de mieloma X63/Ag8.653 (deficiente en HGPRT). Las células Ag8, en DME-S, se mantuvieron en incubadora a 37°C, con 95% de humedad

y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se cosecharon en fase de crecimiento logarítmica para emplearlas en la fusión.

#### Células esplénicas inmunes.

Cuatro días después de la última inmunización (ver esquema de inmunización descrito anteriormente), en condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo y se depositó en una caja petri conteniendo 5 ml de solución de Hanks. Dentro de una campana de flujo laminar, con el objeto de liberar las células plasmáticas, se disgregó el bazo. La suspensión así obtenida, se dejó sedimentar durante 5 min con el fin de eliminar los restos tisulares. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 1200 rpm/5 min. El sedimento se resuspendió en 5 ml de DME y el número de células viables se contó en una cámara de Newbauer, mezclando dos gotas de la suspensión de células con dos gotas de azul tripán al 0.2%.

#### Fusión.

La fusión se efectuó, de acuerdo al método descrito por Koller y Milstein<sup>58 59</sup> y modificado por Baron, D.<sup>60</sup>. Para esto, en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml, se colocaron y centrifugaron (1200 rpm/5 min)  $6.6 \times 10^6$  células de bazo/ml y  $3.3 \times 10^6$  células Ag8/ml; la pastilla celular resultante se le agregó lentamente 1 ml de polietilenglicol 4000 (Gibco, BRL). Después de dejar reposar la mezcla 1 min a 37°C, se agregaron 8 ml de DME gota a gota, y se dejó reposar 5 min a 37°C. Posteriormente se adicionaron 30 ml de DME y después de 5 min se centrifugó a 800 rpm/5 min. La pastilla se resuspendió

suavemente en 5 ml de medio DME-S y se agregaron 50 ml de esta suspensión en cada uno de los 96 pozos de una placa de cultivo (Nunc, Co.), la cual había sido recubierta con macrófagos. Veinticuatro horas después, se reemplazó el medio DME-S por medio HAT (DME suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina). Posteriormente el cambio de medio se realizó cada tercer día. Al décimo cuarto día de cultivo, el medio HAT se sustituyó por medio HT (DME suplementado con hipoxantina y timidina). Las células se mantuvieron en este medio hasta el día 19.

#### Selección y clonación de hibridomas.

Cuando los hibridomas cubrieron la tercera parte del fondo del pozo de cultivo, se tomó el sobrenadante para cuantificar, por el método de GM1-ELISA, la presencia de anticuerpos específicos. Para esto se emplearon las construcciones de las proteínas híbridas, que llevaban consigo las secuencias de las regiones descritas. Los hibridomas secretores de anticuerpos anti-péptido, se clonaron dos veces por el método de dilución limitante.

#### Expansión de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

La expansión *in vitro*, se realizó en botellas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> (Nunc, Co.). Los sobrenadantes resultantes se utilizaron para determinar la especificidad del anticuerpo y su capacidad para reconocer a la porina nativa y a la bacteria completa.

La expansión *in vivo*, se realizó en ratones BALB/c, inoculados por vía i.p., 15 días antes con 0.5 ml de pristano (2,6,10,14, tetrametilpentadecano. Sigma, Co.). Cuando el tumor se hizo evidente, se obtuvo el líquido de ascitis mediante punción peritoneal.

#### Almacenamiento de células.

Con el objeto de conservar a los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, se prepararon viales conteniendo de 1 a  $5 \times 10^6$  células en solución crioprotectora (9 volúmenes de suero fetal bovino y 1 volumen de dimetilsulfóxido), los cuales se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 24 h y posteriormente en nitrógeno líquido.

## RESULTADOS.

### - Selección de los péptidos.

Las secuencias que se evaluaron como probables epitopos de B se seleccionaron de acuerdo a tres parámetros: *Primero*. Las regiones debían de tener un alto grado de hidrofiliidad y flexibilidad, de acuerdo al análisis de la predicción de estructura secundaria con los métodos de Van Regenmortel <sup>24</sup>, Hoop and Woods <sup>30</sup>, Jahning <sup>28</sup> and Fasman <sup>29</sup>. *Segundo*. El alineamiento de la secuencia de OmpC de *S. typhi* con las de OmpF y OmpC de *E. coli* debían de mostrar que los probables epitopos de B estuvieran expuestos en la superficie de la bacteria. *Tercero*. Las secuencias deberían de ser especie-específicas de la OmpC de *S. typhi*.

Mediante el análisis computacional, se predijeron varios candidatos a epitopos de B en la secuencia de la porina OmpC de *S. typhi*. Después de comparar estas regiones con las secuencias de aminoácidos de las porinas OmpF y OmpC de *E. coli*, dos regiones: 246-255 (TSNGSNPDT) y 286-303 (QSKGKDISNGYGGASYGDQD) fueron predichas a estar expuestas en la superficie celular de la bacteria. La región 246-255 no está compartida con las porinas OmpF y OmpC de *E. coli*. La secuencia 286-303 también está expuesta en la superficie de la bacteria, pero es parcialmente homóloga a las porinas de *E. coli* (Figura 3\*).

La comparación entre las secuencias de las porinas OmpC de *S. typhi* y OmpF de *E. coli*, así como el análisis computacional para predecir la estructura secundaria de la porina, han permitido proponer un modelo topológico para la misma (Figura 4), en donde se localizan estas dos regiones en el asa 6 (246-255) y en el asa 7 (286-303). En función de lo descrito, estas dos secuencias fueron seleccionadas para los análisis posteriores, por lo que se sintetizaron como se describe en materiales y métodos.

---

\* **Figura 3. Selección de los péptidos.** a) Alineamiento de las secuencias de las porinas OmpC de *S. typhi* y *E. coli*. b) Las regiones indicadas corresponden a las secuencias seleccionadas. (Siguiete página).

1.a)

OMPCSTYPH1-	AEIYNKDGKLDLFGKVDGLHYFSDDKGSDDQTYMRLGFKGETQVNDQL	-50
OMPCECOLI1-	AEVYNKDGKLDLYGKVDGLHYFSDDKDVDDQTYMRLGFKGETQVTDQL	-50
OMPCSTYPH1-	TGYGQWEYQIQGNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADAGSFDYGRNYGVYDV	-100
OMPCECOLI1-	TGYGQWEYQIQNSAENENNSWTRVAFAGLKFQDVGSFDYGRNYGVYDV	-100
OMPCSTYPH1-	TSWTDVLPFEGDITYGADNFMQQRGNGYATYRNTDFGLVDGLDFALQYQ	-150
OMPCECOLI1-	TSWTDVLPFEGDITYGSDNFMQQRGNGFATYRNTDFGLVDGLNFAVQYQ	-150
OMPCSTYPH1-	GKNGSVSGE-----NTNGRSLLNQNGDGYGGSITYAIGEGFEVCGAITT	-194
OMPCECOLI1-	GKNGNPSGEGFTSGVTNNGRDALRQNGDGVGGSITYDY-EGFGIGGAISS	-199
OMPCSTYPH1-	SKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSQTYNATR	-244
OMPCECOLI1-	SKRTDAQNTAA--YIGNGDRAETVTGGLKYDANNIYLAAQYTQTYNATR	-246
OMPCSTYPH1-	FGTSNGSNPSTSYGFANKAQNFVVAQYQDFGLRPSVAYLQSKGRDISN	-294
OMPCECOLI1-	VG-----SLGWANKAQNFVAQYQDFGLRPSLAYLQSKGKNLGR	-287
OMPCSTYPH1-	GYGASYGDNDIVKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDKNDFTRDGIN	-343
OMPCECOLI1-	GY----DDEDILKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNQFTRDGIN	-333
OMPCSTYPH1-	TDDIVALGLVYQF	-356
OMPCECOLI1-	TDNIVALGLVYQF	-346

1.b)

	246	255
<i>S. typhi</i>	YNATREFGTSNGSNPSTSYGFA	
<i>E. coli</i>	YNATRVG	:SLGWA
	286	303
<i>S. typhi</i>	VAYLQSKGKDISNGYGASYGDND:	
<i>E. coli</i>	LAYLQSKGKNLGRGY	DDED:

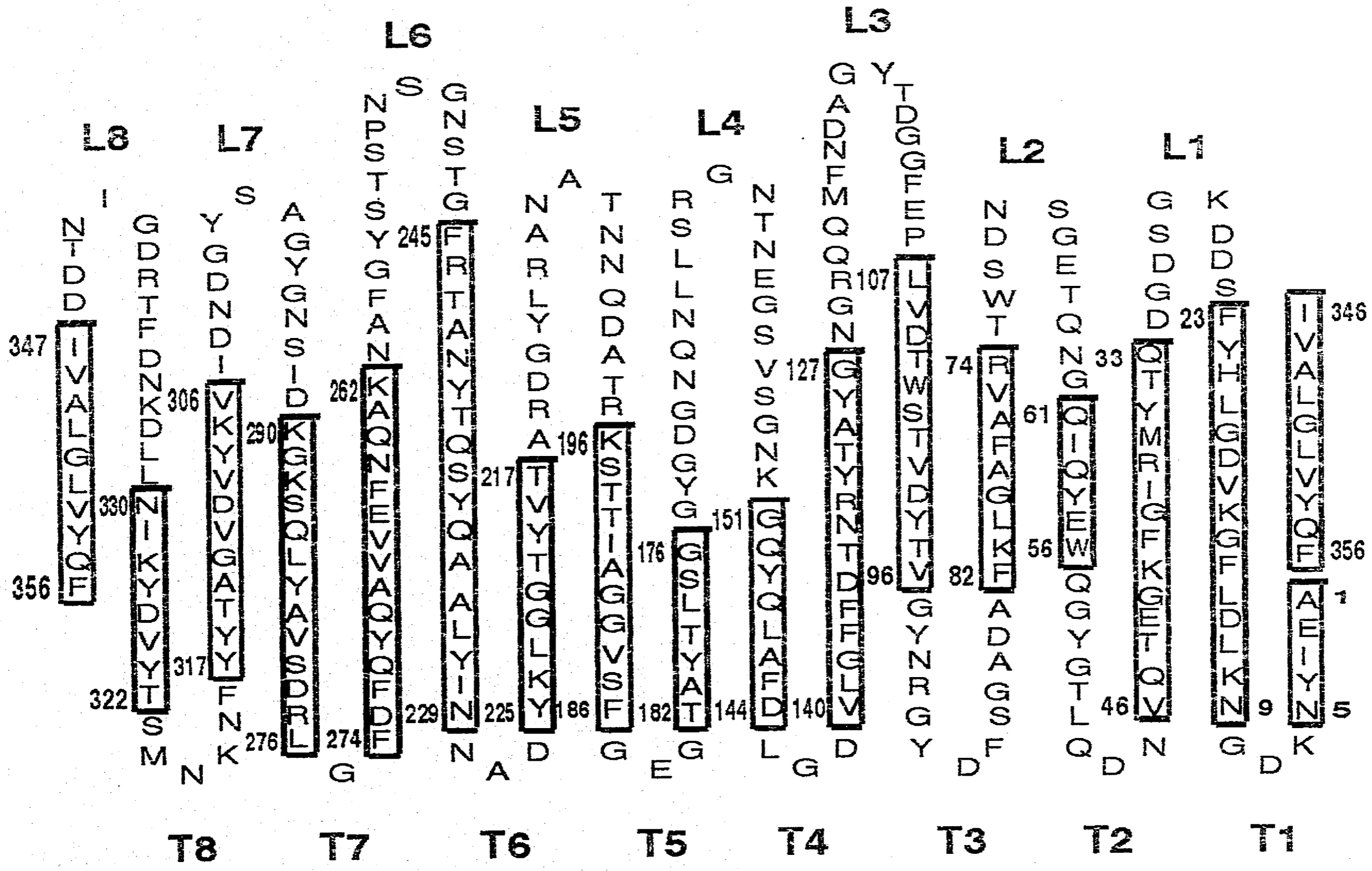


Figura 4. Modelo topológico de la porina OmpC de *Salmonella typhi*. El modelo fue desarrollado empleando varios algoritmos de predicción de estructura secundaria y por comparación con los datos cristalográficos de la porina OmpF de *Escherichia coli*.

**- Conjugación a proteínas acarreadoras.**

Conjugados

Los conjugados se eluyeron y las fracciones se monitorearon por su absorbancia a 280 nm. Se emplearon en el esquema de inmunización descrito en materiales y métodos.

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 5, donde puede observarse que el título en los sueros de los ratones inmunizados es tres veces mayor que el título previo a la inmunización.

**- Reactividad de los anticuerpos anti-péptido con la porina OmpC nativa.**

La figura 6 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.

**- 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 7, 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  $10^{-6}$  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.



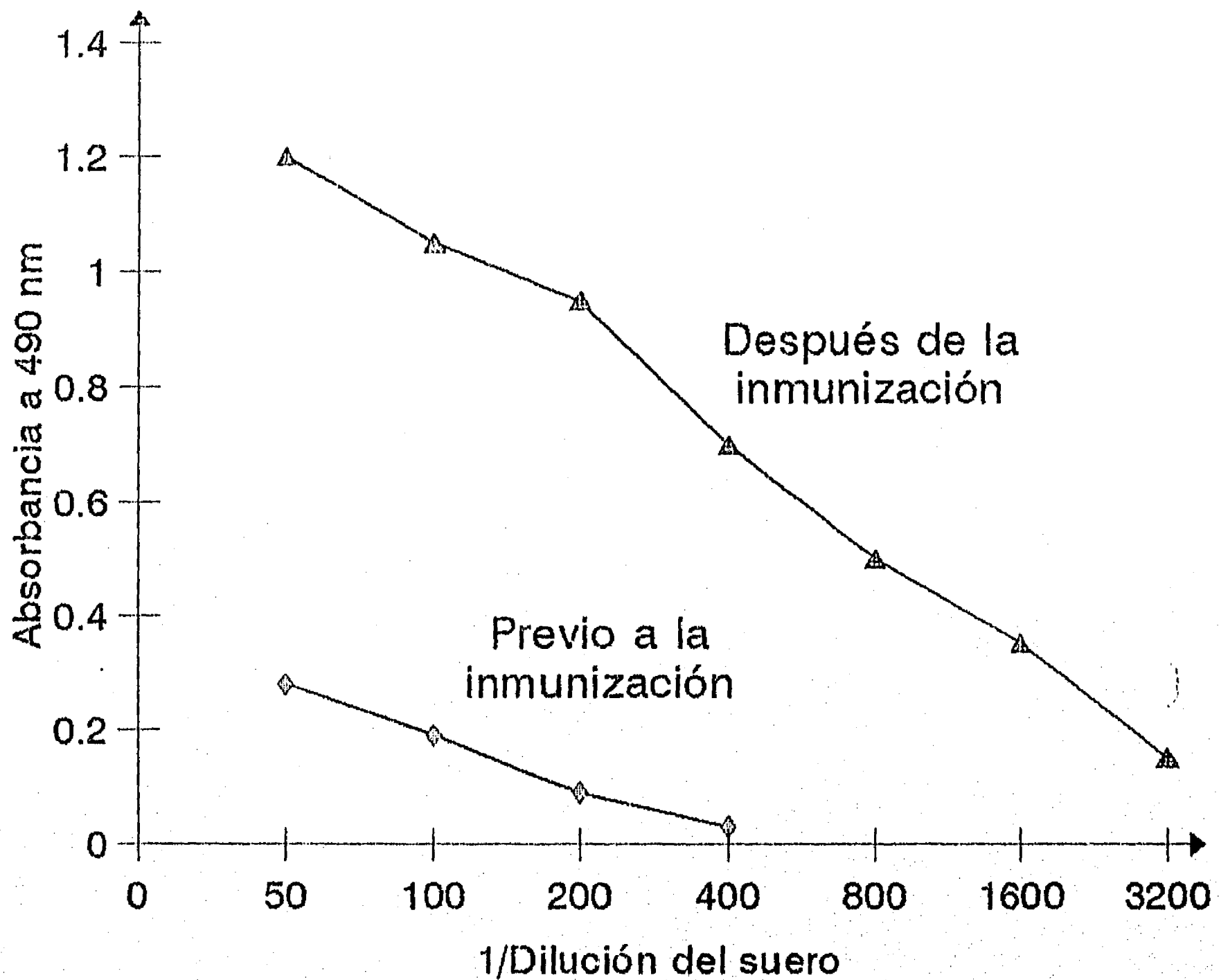


Figura 5. Reactividad del suero de ratón contra el conjugado lisozima-péptido. El suero de ratones inmunizados con los conjugados BSA-péptido y KLH-péptido se tituló mediante un ensayo de ELISA empleando placas recubiertas con  $5\mu\text{g}/\text{pozo}$  del conjugado HEL-péptido. Se muestran resultados para el péptido 286-303.

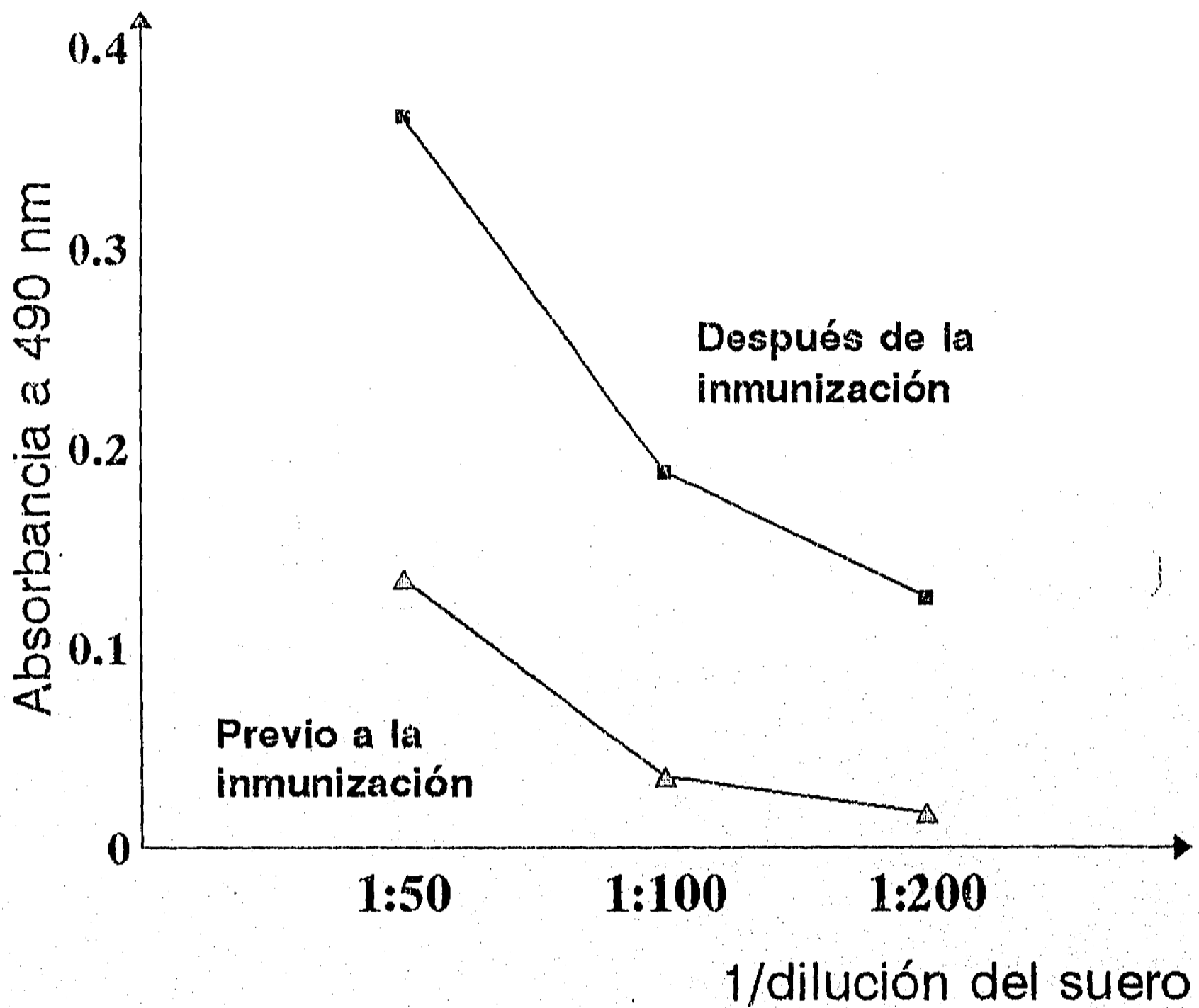


Figura 6. Los anticuerpos anti-péptido reconocen a la porina rOmpC. Se investigó la reactividad del suero de los ratones inmunizados con los conjugados (ver figura 5) contra la porina nativa, empleando un ensayo de ELISA, usando como antígeno rOmpC a una concentración de  $2\mu\text{g}/\text{pozo}$ .

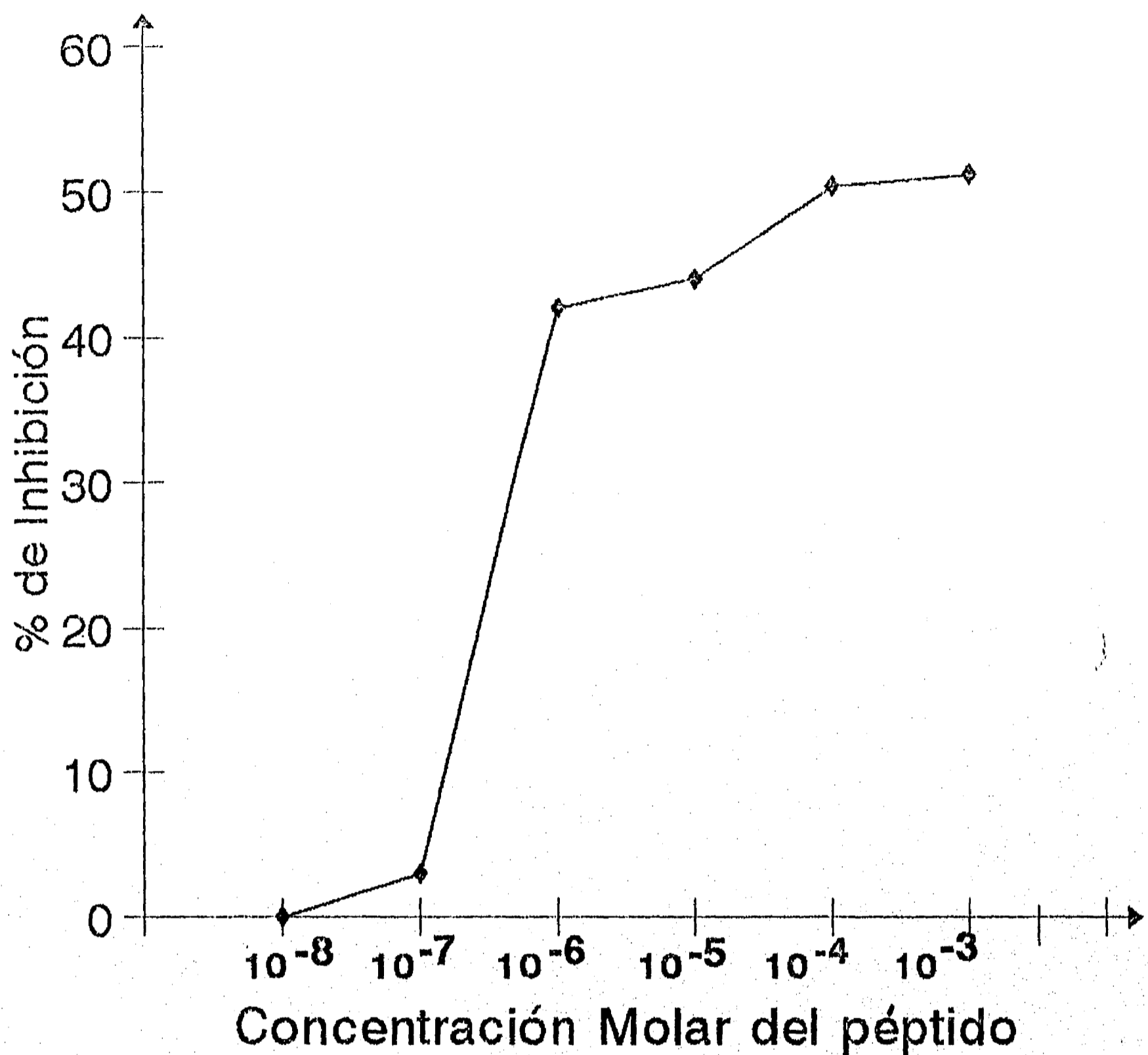


Figura 7. El péptido libre compite por la unión al anticuerpo. El anticuerpo se incubó previamente con cantidades variables del péptido libre. El porcentaje de inhibición se midió por la disminución de la unión del anticuerpo al conjugado HEL-péptido en un sistema de ELISA.

**- Reactividad del suero anti-péptido contra la porina nativa.**

Ratones C3H/FeJ se inyectaron con el conjugado peptidil-resina, tal como se describe en materiales y métodos. Los péptidos se administraron en la forma acoplada para que la resina actúe como un acarreador. Los anticuerpos en contra de las secuencias específicas se analizaron por ELISA empleando placas cubiertas con la porina rOmpC aislada de *E. coli* UH302/pST13.

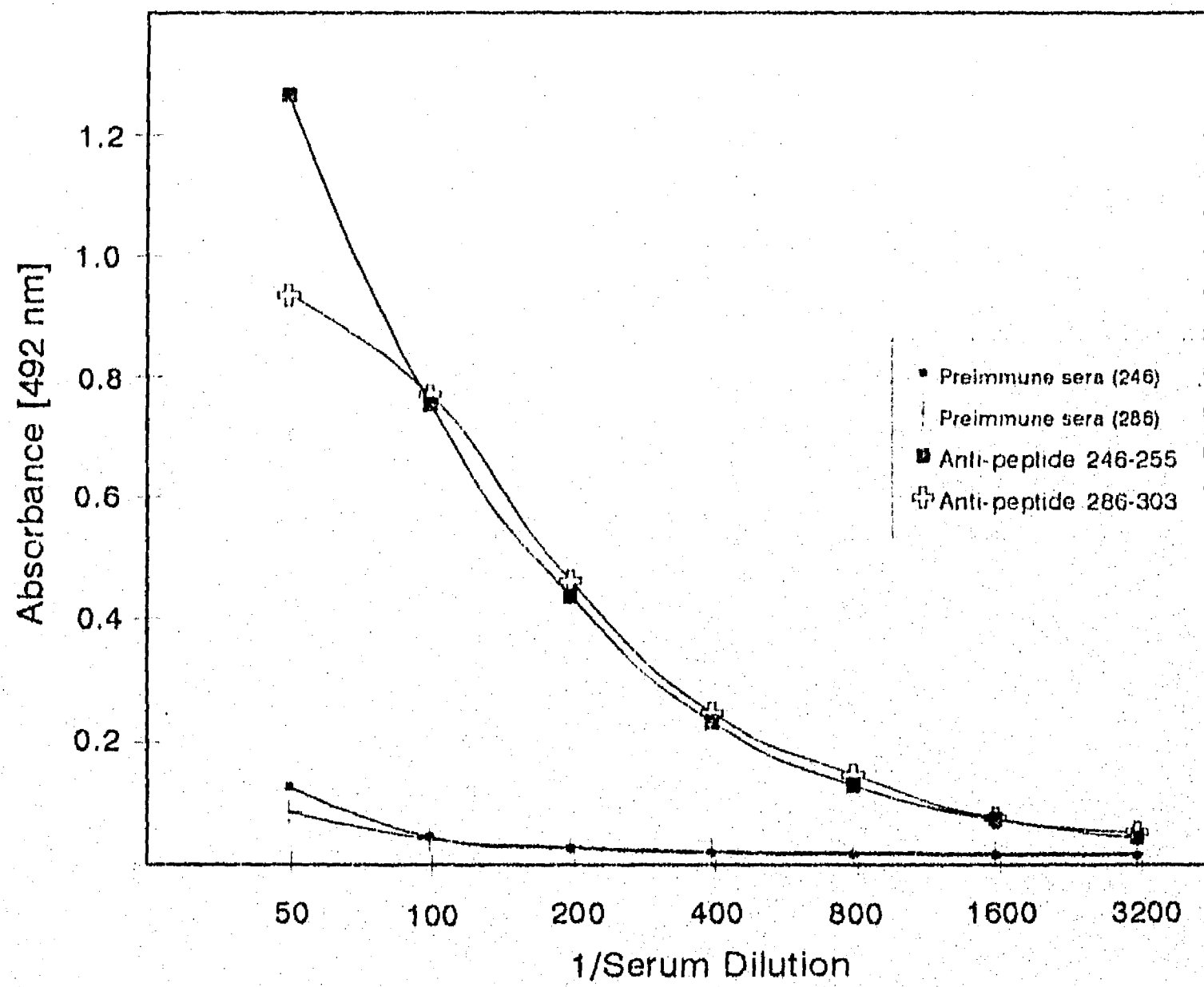
Ambos péptidos, 246-255 y 286-303, fueron capaces de inducir una buena respuesta de anticuerpos en contra de la proteína recombinante. Estos resultados sugieren que los péptidos sintéticos son capaces de imitar las propiedades inmunológicas de la proteína, especialmente la conformación de los epitopos nativos. No se encontró reactividad específica en el suero preinmune. (Figura 8\*). Se observó una respuesta similar de anticuerpos cuando se utilizaron como acarreadores a las proteínas KLH, OVA o HEL (Figura 5).

**- Reconocimiento de la porina OmpC en la superficie de la bacteria, por los anticuerpos anti-péptido.**

Los resultados anteriores demostraron que los anticuerpos contra los péptidos 246-255 y 286-303, reconocen a la porina rOmpC de *S. typhi* mediante un ensayo de ELISA. Posterior a esto se realizaron ensayos de citometría de flujo, para determinar si estos anticuerpos podrían reconocer a la porina OmpC nativa sobre la superficie de la bacteria intacta. *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d se mezcló con el suero anti-péptido y después de eliminar aquellos anticuerpos que no se unieron, se detectó la reacción con un anticuerpo anti-cadena pesada de IgG, conjugado a fluoresceína (Gibco-BRL). Se midió la fluorescencia de muestras que contenían 10,000 células. La unión no-específica de los

---

\* **Figura 8. Reactividad del suero anti-péptido contra la porina rOmpC.** El antisuero se produjo por inmunización con el péptido sintético acoplado a la resina (regiones 246-255 y 286-303 de OmpC). El título de anticuerpos se midió por ELISA. Se ensayaron diluciones seriadas dobles del suero y se evaluó su unión a la porina OmpC inmobilizada en la placa. Cada punto es un promedio de dos determinaciones. (Siguiendo página).



anticuerpos se midió utilizando el suero del ratón preinmune, el cual presentó una media de fluorescencia (MFC) de 5.6. Los anticuerpos anti-péptido 246-255 y 286-303, reconocieron a los epitopos específicos en la OmpC de *S. typhi*, como lo demuestra el incremento en la media de fluorescencia (MFC=60 y 198 respectivamente), demostrándose que ambos péptidos están expuestos sobre la superficie de la bacteria (Figura 9\* ).

#### **- Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-péptido.**

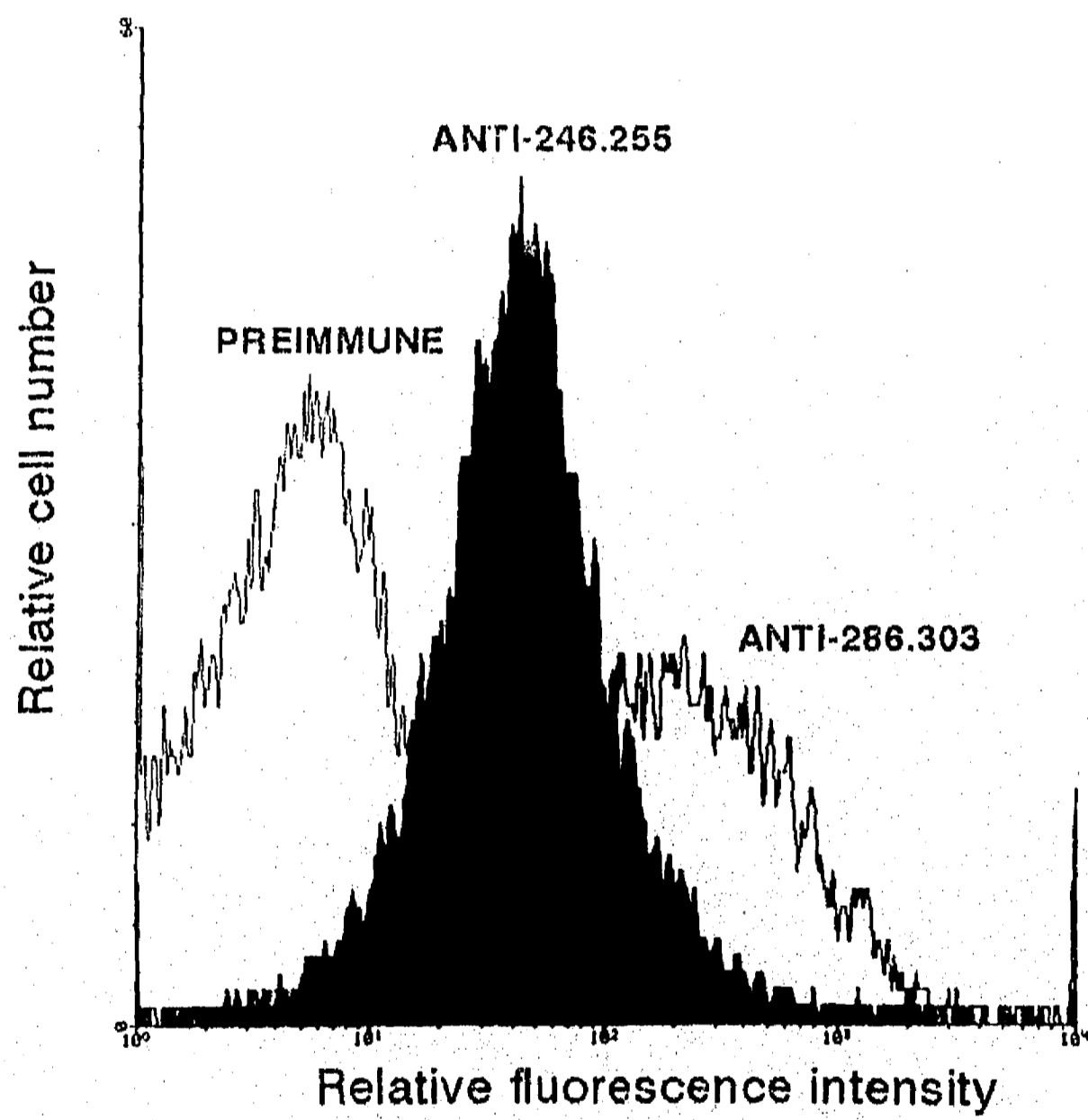
Debido a la similitud parcial de la región 286-303 entre las porinas OmpC de *S. typhi* y *E. coli*, probamos la reactividad del suero anti-péptido 286-303 en contra de la bacteria *E. coli* completa. En la Figura 10, se puede observar una ligera reactividad cruzada, lo cual puede sugerir que la respuesta de anticuerpos está dirigida principalmente en contra de los residuos no conservados de este epitopo que son los que están expuestos en la superficie de la bacteria. No se observó reactividad al utilizar el suero preinmune o el suero anti-péptido 246-255.

#### **- Proteínas híbridas PAP-CTB.**

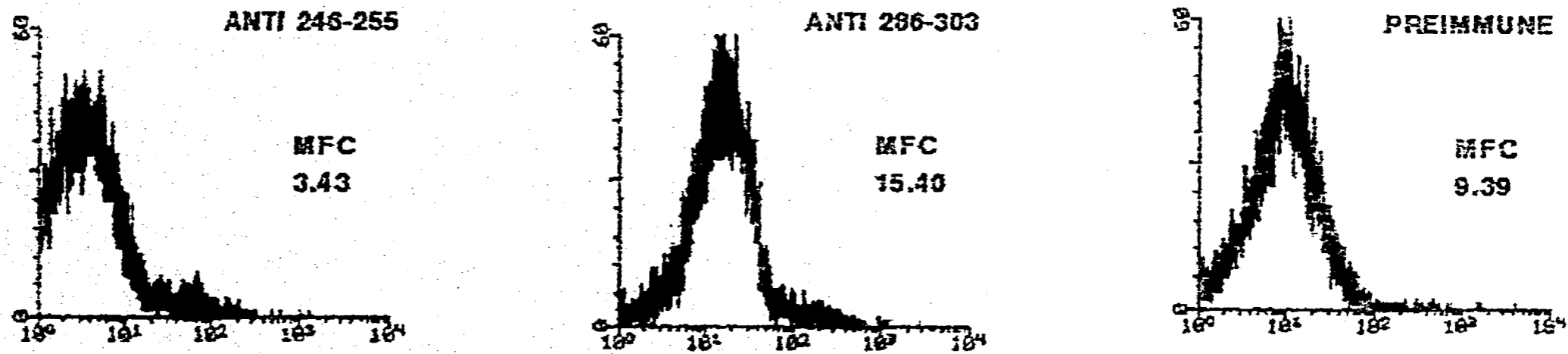
Después del alineamiento de las secuencias de las porinas Omp C (Figura 3), observamos que la secuencia *Salmonella typhi*-específica es 246-255. Por lo tanto, con estos datos de antigenicidad y de particularidad de la secuencia, se decidió sintetizar los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia 246-255 (GTSNGSNPST) (Figura 11A), tal y como se describió en materiales y métodos. El aminoácido 246 (G) nos permite adicionar el sitio Kpn I y forma parte de la secuencia de la porina Omp C. Esta misma estrategia se utilizó para construir las proteínas híbridas con la secuencia de las asas 7 de Omp C de *S. typhi* (Figura 11A). A estas construcciones se les denominó *16-ctb* y *17-ctb* y a las proteínas de fusión recombinantes producto de estos genes L6-CTB y L7-CTB respectivamente.

---

\* **Figura 9. Reconocimiento de la superficie de *S. typhi* por los anticuerpos anti-péptido.** Se muestra un experimento representativo del análisis por citometría de flujo. La bacteria se preparó y se tiñó como se describe en materiales y métodos. (Siguiendo página)



Número relativo de células



Intensidad de la fluorescencia

Figura 10. Reactividad cruzada de los sueros anti-péptido de la porina OmpC de *S. typhi* contra *E. coli* completa. La bacteria se preparó tal y como se describe en materiales y métodos. Análisis por citometría de flujo de un experimento representativo.



### Fusiones genéticas.

El plásmido pJS 752-3 fue digerido, purificado y ligado. Cinco ml de esta mezcla se utilizaron para transformar células competentes. Se obtuvieron 33 colonias en dos experimentos por separado y de estas se analizaron las primeras 7. En cinco de ellas se observó el patrón característico de la construcción planeada. En la Figura 11B\* se muestra el mapa del plásmido pJS 752-3, en el cual se indican con flechas los sitios XmaI y SacI, donde fueron insertados los oligonucleótidos.

### **- Análisis de restricción de la construcción genética.**

Se seleccionaron algunas colonias de la cepas de *E. coli* DH5a/pJAK, 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 11C; en el cual se observa al plásmido pJAK (carril 2), con dos bandas, de aproximadamente 1.2 kb y 4.7 kb respectivamente; mientras que el plásmido original pJS752-3 (carril 1), solo presenta una banda de aproximadamente 5.9 kb.

### Expresión de la proteína híbrida PAP-CTB en *E. coli* DH5a.

Se investigó la expresión de la proteína híbrida mediante la técnica de ELISA, empleando como estándar diluciones de CTB (a una concentración inicial de 1 mg/ml. En la Figura 12, podemos observar que la cantidad de PAP-CTB determinada como concentración equivalente de CTB es muy semejante a la obtenida en los sobrenadantes de las colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido pJS 752-3 original usadas como control. De esta manera podemos demostrar que las proteínas recombinantes poseen una afinidad normal a GM1, es decir que el péptido insertado no está interfiriendo con la unión.

---

\* **Figura 11. Diseño del gen que codifica para las proteínas de fusión L6-CTB y L7-CTB.** A) Oligonucleótidos complementarios que codifican para las asas 6 y 7. B) Mapa del plásmido pJS 752-3, con las flechas se indican los sitios de restricción para las enzimas Sac I y Xma I, en donde los oligonucleótidos se insertaron. C) Análisis de restricción con las enzimas Eco RI y Hind III del plásmido parenteral pJS 752-3 (carril 1) y de la construcción pJAK (carril 2). Estándares Kb leader (carril 3) de GIBCO-BRL.

**A**    **Loop 6**

246    255

          ↓    ↓

*Sac I*    G T S N G S N P S T                          *Xma I*

          GGT ACC AGC AAC GGT AGC AAC CCT AGC ACC C

          T CGA CCA TGG TCG TTG CCA TCG TTG GGA TCG TGG GGG CC

          ↑

*Kpn I*

**Loop 7**

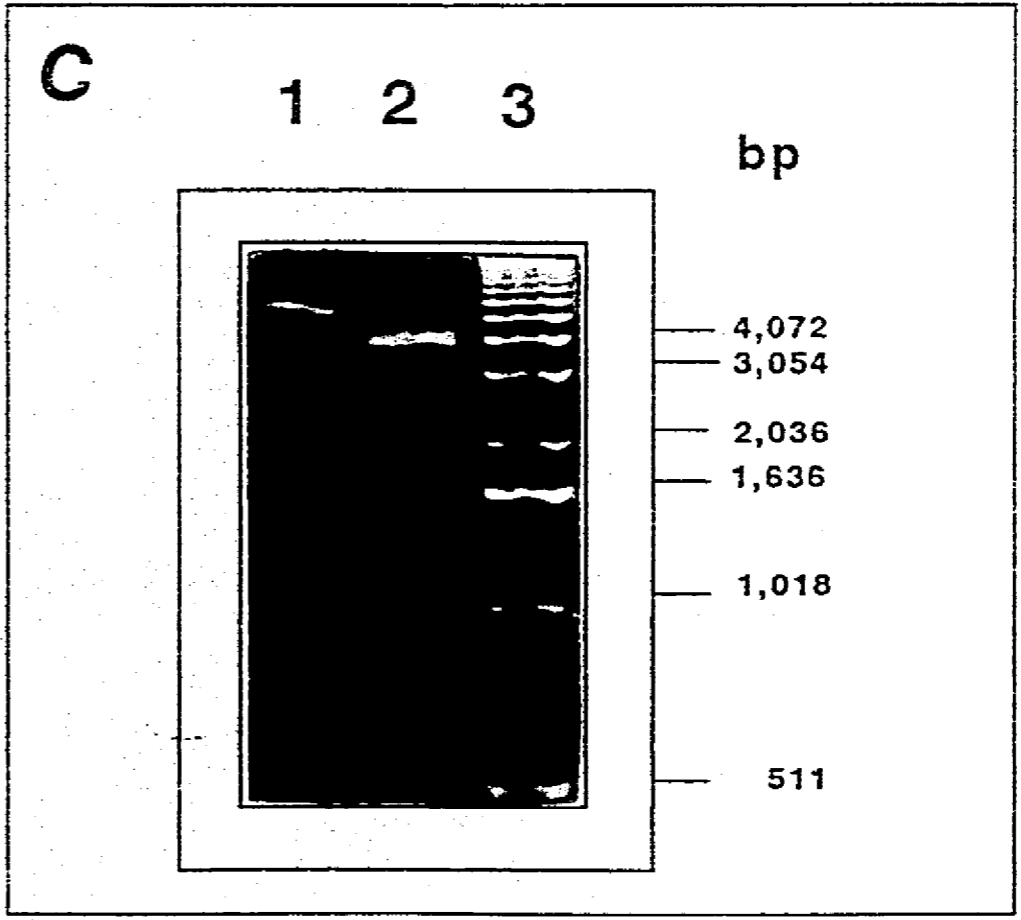
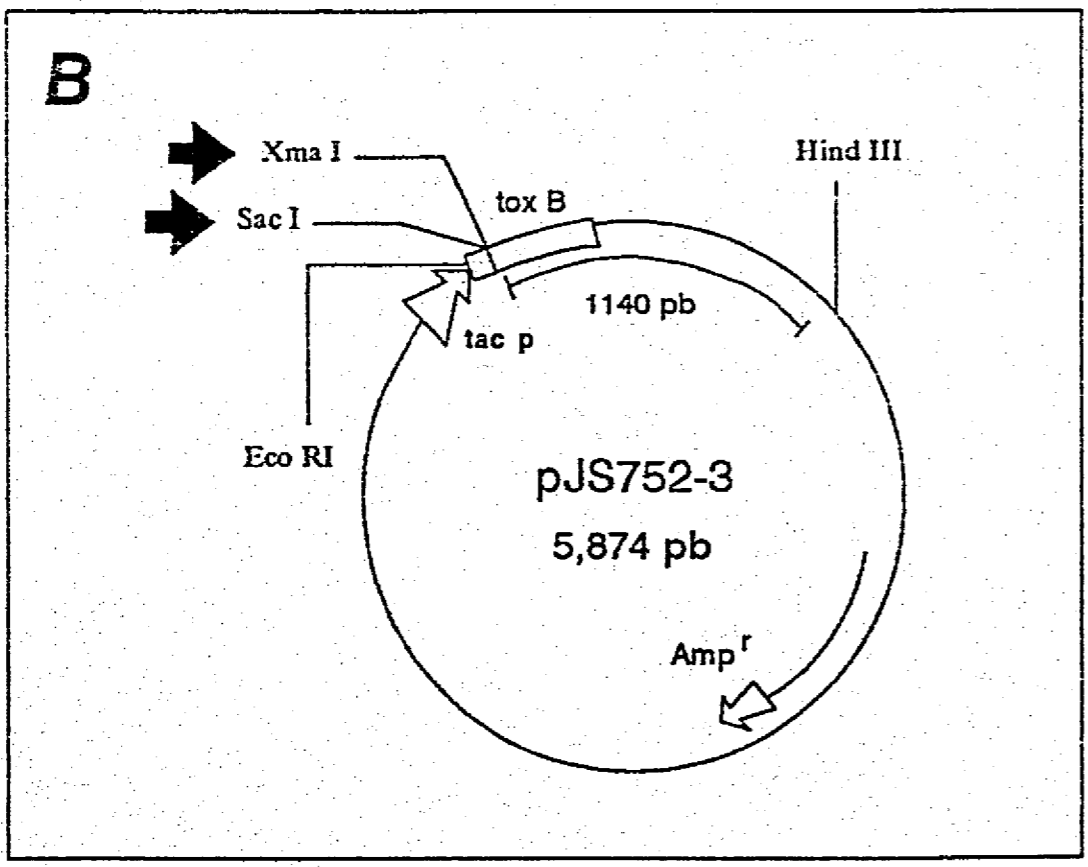
290    303

          ↓    ↓

*Sac I*    K D I S N G Y G A S Y G D                          *Xma I*

          AAA GAC ATC TCT AAC GGT TAT GGT GCT TCT TAT GGT GAC GAG C

          T CGA TTT CTG TAG AGA TTG CCA ATA CCA CGA AGA ATA CCA CTG CTC GGG CC



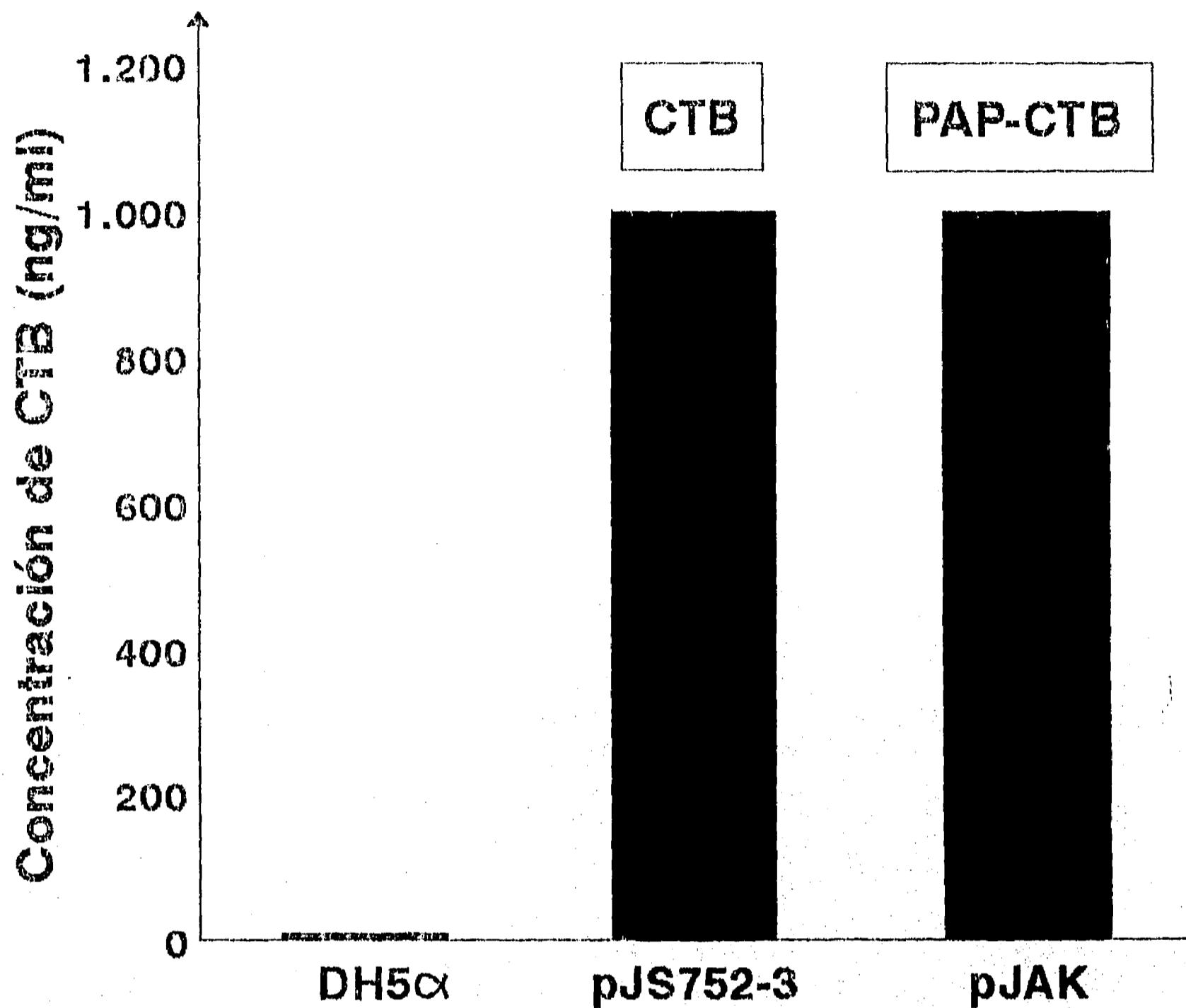


Figura 12. La presencia del péptido en la molécula híbrida no impide su reconocimiento por GM1. La cantidad de PAP-CTB producida por la bacteria transformada con el plásmido pJAK es similar a la cantidad de CTB producida por la bacteria transformada con el plásmido parenteral. Se empleó el sistema GM1-ELISA y una curva standard de diluciones de CTB a una concentración inicial de 1 $\mu$ g/ml. Se incluye como control el sobrenadante de DH5-alfa.

### Caracterización de las proteínas de fusión.

Las proteínas de fusión L6-CTB y L7-CTB se caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE), a partir de sobrenadantes de cultivo concentrados por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% (Figura 13<sup>♦</sup>). Las proteínas de fusión tienen un comportamiento consistente con lo esperado ya que la movilidad electroforética de la PAP-CTB (carril 2) es menor que la de CTB nativa (carril 1) debido a la presencia del inserto. Para confirmar esta diferencia en movilidad se hizo una mezcla de CTB nativa y PAP-CTB (carril 3).

### **- Identificación del péptido 246-254 en la proteína híbrida con el suero anti-porinas.**

Mediante el sistema de GM1-ELISA se determinó si el péptido fusionado a la CTB era reconocido por anticuerpos en contra de la proteína nativa. Para esto, se utilizó la proteína de fusión PAP-CTB de los sobrenadantes de cultivo y un suero policlonal anti-porinas desarrollado en conejo. En la figura 14 se observa que el suero reconoce a la proteína de fusión secretada por la clona pJAK, de dos a tres veces más que al sobrenadante de la cepa no recombinante *E. coli* DH5a y que a la CTB nativa de la clona pJS752-3.

### **- Anticuerpos Monoclonales.**

Los sobrenadantes de L6-CTB o de L7-CTB se usaron para rastrear anticuerpos monoclonales específicos en el sobrenadante de los hibridomas.

---

<sup>♦</sup> **Figura 13. Análisis electroforético (SDS-PAGE) del sobrenadante de cultivo de *E. coli* transformada con el plásmido pJS 752-3-L6 (pJAK).** Carril 1, *E. coli* DH5-alfa transformada con el plásmido pJS 752-3. Carril 2, *E. coli* DH5-alfa transformada con el plásmido pJAK. Carril 3, mezcla de los sobrenadantes de los carriles 1 y 2. Las flechas indican las proteínas CTB y L6-CTB. (Siguiendo página).

KDa

MW

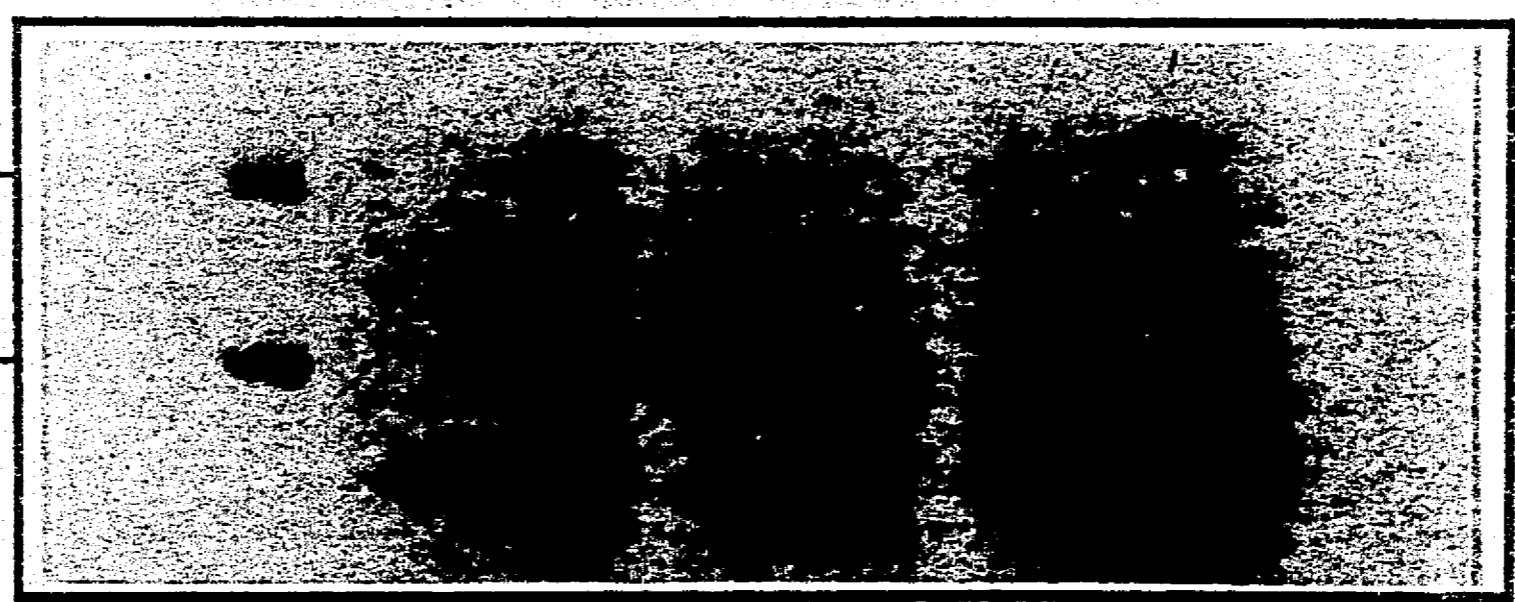
1

2

3

21

14



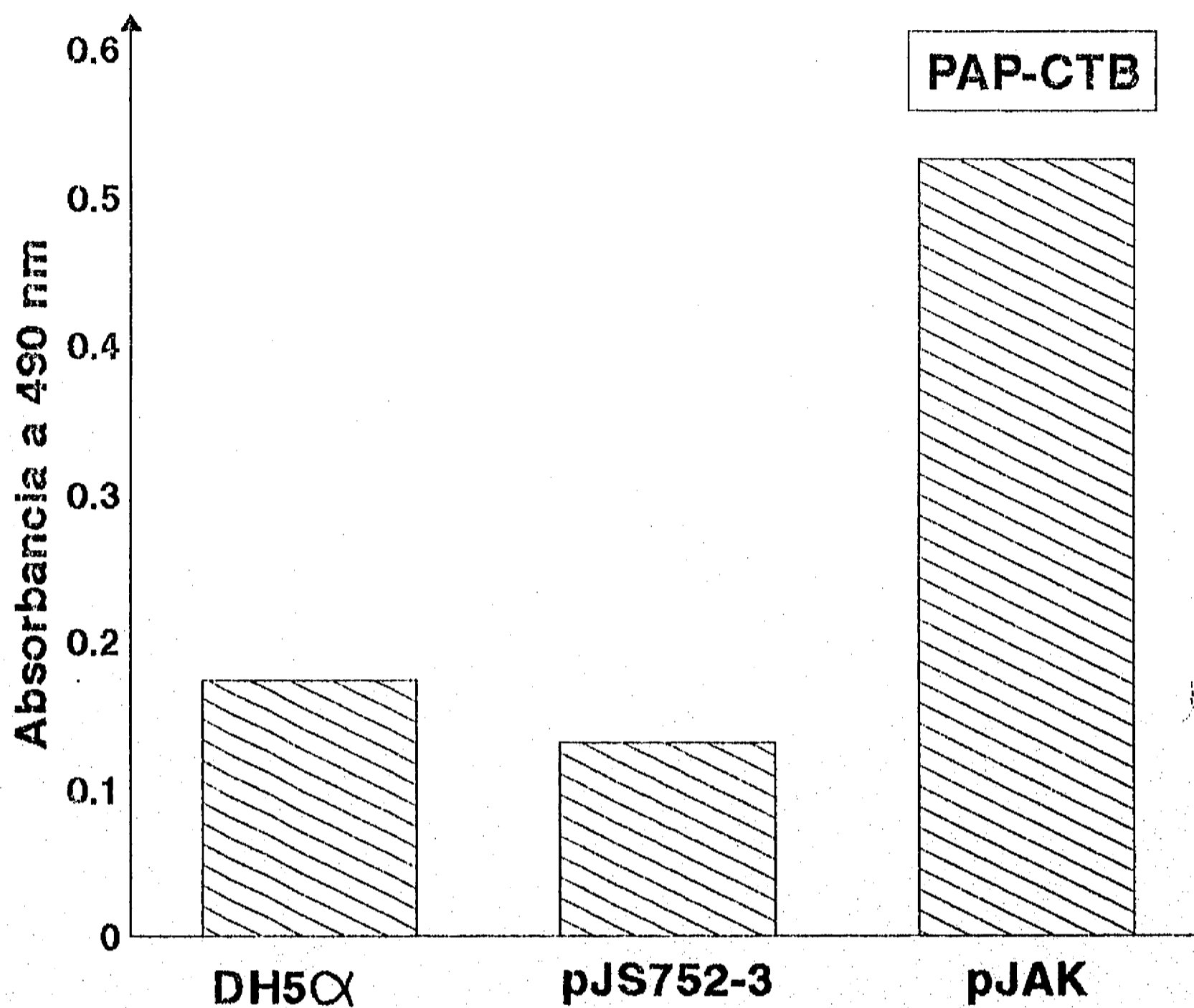


Figura 14. La construcción PAP-CTB es reconocida por anticuerpos anti-porinas. El suero de conejo anti-péptido sintético reconoce a la construcción pJAK y no a la CTB en el sistema GM1-ELISA. Se incluye el sobrenadante de DH5-alfa como control.

#### **- Rastreo de los hibridomas.**

Después de seleccionar las clonas positivas, los híbridos se expandieron y la reactividad de los sobrenadantes de cultivo se probaron contra la proteína recombinantes relevante, en el sistema GM1-ELISA; empleando para ésto como controles sobrenadantes de la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$  sin plásmido y esta cepa transformada con el plásmido parenteral pJS 752-3. Así como manera cruzada de empleó la construcción que llevaba a la otra asa y la construcción L8-CTB como tercer control. Se observa que el sistema fue eficiente para seleccionar las clonas positivas deseadas (Figura 15<sup>\*</sup>).

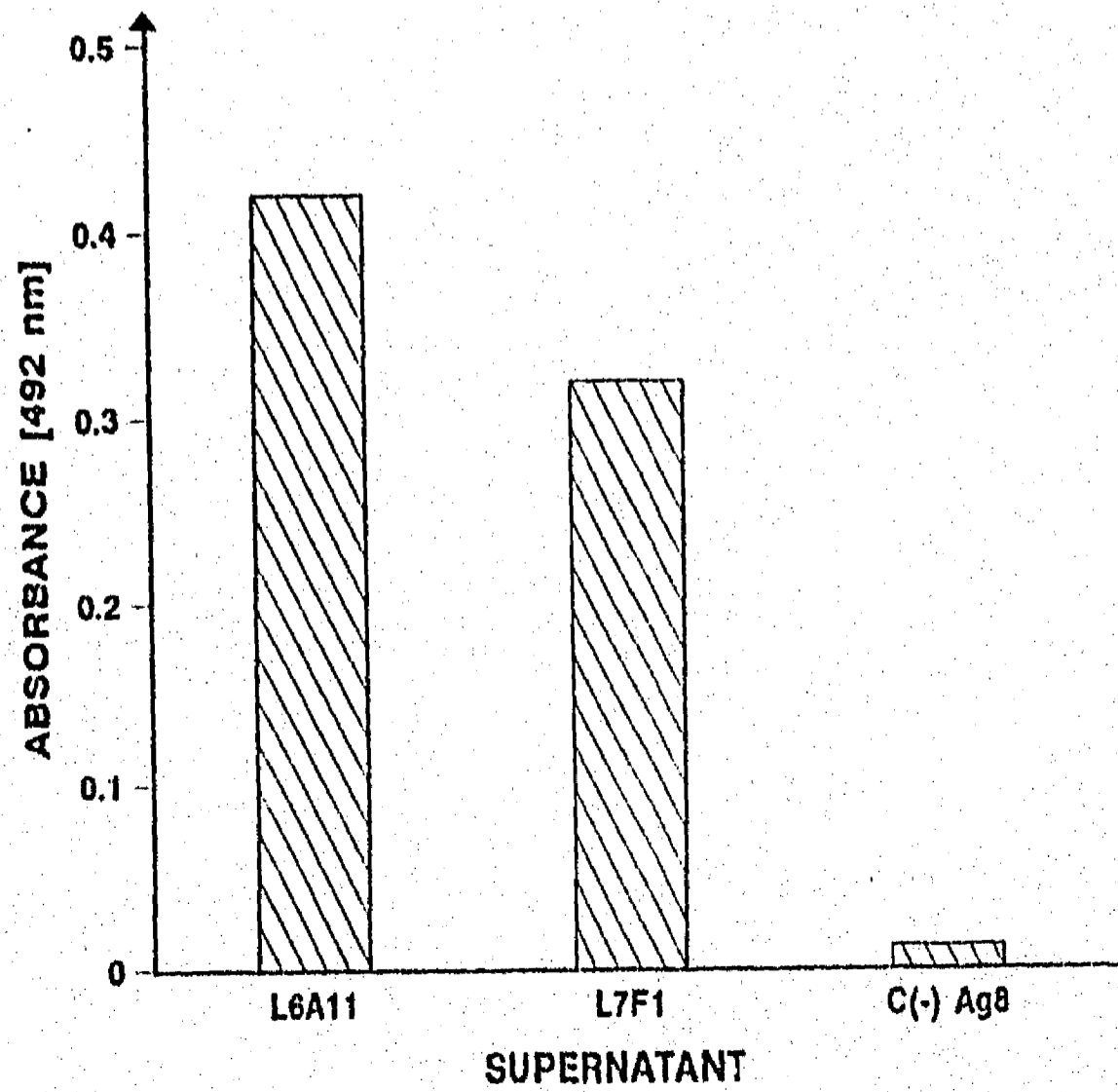
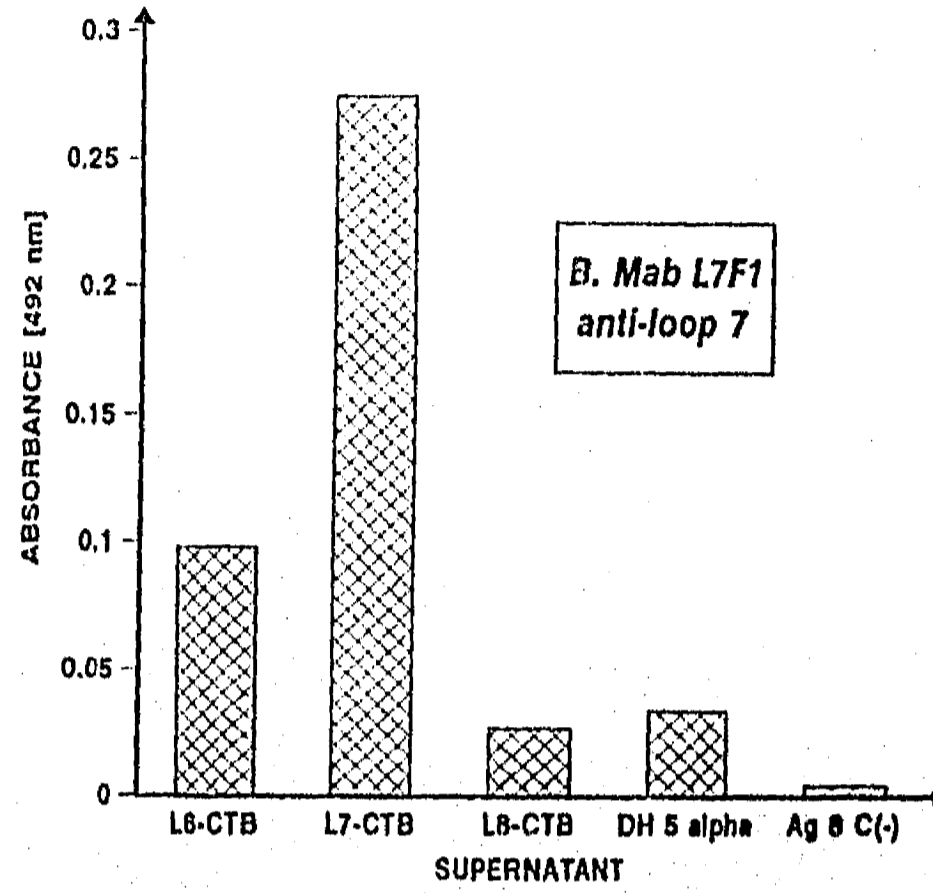
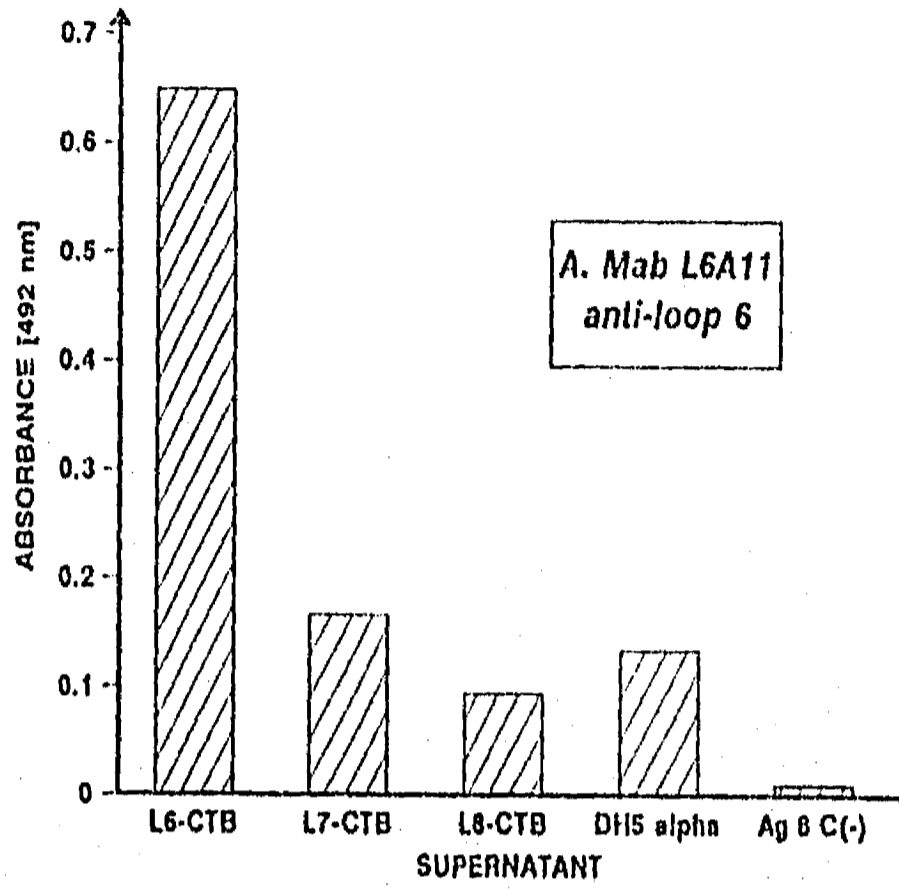
#### **- Reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-péptido contra la porina rOmpC y la bacteria completa.**

Para determinar si la reactividad hacia las proteínas de fusión correlaciona con la porina rOmpC aislada, se probaron los anticuerpos monoclonales poniéndolos a reaccionar (sobrenadantes de hibridomas) sobre placas de microtitulación recubiertas con la proteína rOmpC. La reacción positiva en ELISA confirmó que los anticuerpos seleccionados reconocían a sus correspondientes regiones en la proteína rOmpC purificada (Figura 16<sup>o</sup>). De la misma manera estos anticuerpos fueron capaces de reconocer, presumiblemente, a la OmpC sobre la superficie de la bacteria *S. typhi*, mediante un ensayo con citometría de flujo (Becton Dickinson), interpretado como el desplazamiento del pico de fluorescencia.

---

\* **Figura 15. Análisis de la especificidad del anticuerpo monoclonal en contra de las secuencias L6 y L7 empleando un sistema de GM1-ELISA.** A) Anticuerpo monoclonal anti-L6 and B) anticuerpo monoclonal anti-L7. L8-CTB fue utilizado como un control. Como control positivo se empleó un anticuerpo monoclonal contra CTB (LT39) [D.O. 1.21]

<sup>o</sup> **Figura 16. Reconocimiento de la porina OmpC recombinante de *S. typhi* por anticuerpos monoclonales anti-L6 y anti-L7 medido por ELISA.** El suero anti-porina usado como control positivo dió una D.O. de 0.76.(páginas siguientes).





## DISCUSION.

La identificación de epitopos de B, en una proteína puede ser un proceso muy tedioso. Ya que los programas de predicción de estructura secundaria y de regiones expuestas de la proteína no son 100% eficientes, algunos investigadores han preferido sintetizar péptidos traslapados y probar la capacidad antigénica de cada uno de ellos. Este procedimiento es muy cansado y de alto costo. En este trabajo seguimos un estrategia diferente para una proteína de membrana externa. Ya que la estructura de las porinas de las bacterias Gram-negativas son altamente conservadas, asumimos que el arreglo espacial de la porina OmpC de *S. typhi* es muy similar a la porina OmpF de *E. coli*. Sin embargo, la porina OmpC de *S. typhi* debe de tener algunas secuencias específicas y si éstas están expuestas en la superficie, es de esperarse que sean regiones reconocidas por los linfocitos B.

### - Búsqueda de epitopos.

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 el modelo murino . 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*,<sup>61</sup> mediante análisis algorítmicos de la secuencia de la proteína reportada por Puente y cols., así como por Ydelevich y Venegas<sup>62</sup> . A partir de estas predicciones se seleccionaron dos regiones

247-254 [TSNGSNPS] y 285-303 [LQSKGKDISNGYGASYGDQ], para su evaluación inmunoquímica, siguiendo los criterios de hidrofiliidad y flexibilidad y por comparación con las porinas OmpC y OmpF de *E. coli* ser regiones expuestas en la membrana de la bacteria, así como ser secuencias *Salmonella* específicas.

La predicción algorítmica de epitopos, basada en las características fisicoquímicas atribuidas a los determinantes antigénicos, 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. Además en el caso de las proteínas de membrana, la determinación de su topología no se puede dejar única y exclusivamente a los métodos de predicción de estructura secundaria, sino que mientras su cristalografía no sea posible, estas predicciones se deben complementar con estudios genéticos e inmunoquímicos, como se hizo en este trabajo.

#### **- Sistemas acarreador-péptido.**

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. 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"<sup>63</sup>. 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 (Figura 5), donde el título después de la inmunización fue más de cinco 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 carbodiimidias 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 mg de la porina nativa (fig. 6). El péptido 285-303 corresponde tan solo a una pequeña región (19 aa) de la porina, y sin embargo los anticuerpos inducidos por él son capaces de interaccionar con la proteína en su forma nativa. Este hecho muestra que el fragmento 285-303, es una región expuesta en 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 6 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 (Figura 7), muestra que a una concentración del péptido de  $10^{-6}$  M la inhibición es de aproximadamente 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 ser la misma que la de los anticuerpos dirigidos contra segmentos centrales del péptido. Otra explicación también podría ser que el suero empleado estuviera 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 contra el péptido, 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* (Figura 1) reportada por Cowan y Rosenbusch en 1992. Después de alinear las secuencias de Omp F de *E. coli* y Omp C de *S. typhi* y de realizar otras predicciones de su estructura secundaria, se efectuó en nuestro laboratorio una aproximación de la estructura secundaria de la porina Omp C, la cual se muestra en la figura 4. En ella se observa que el

péptido 246-255 está localizado en el asa L6 y el péptido 285-303 en el asa 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.

#### **- Sistema PAP-CTB para expresar fragmentos de porinas.**

Se decidió emplear la proteína de fusión PAP-CTB, producto de una construcción genética entre la subunidad B recombinante de la toxina del cólera (rCTB) y los péptidos de Omp C; debido a que la CTB ha sido empleada con éxito para construir proteínas híbridas portadoras de diversos epitopos <sup>64 65 66</sup>. La CTB es una proteína muy inmunogénica, soluble en agua, resistente a proteólisis, y mantiene su actividad biológica después de ser desnaturalizada y renaturalizada; lo cual favorece su utilidad como acarreador de determinantes antigénicos.

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 (Figura 11). El plásmido pJS752-3 contiene el sitio Hind III; pero no presenta el sitio de restricción KpnI, debido a que éste se generó después de la inserción del oligonucleótido. Por lo tanto, la única banda generada en pJS752-3 por la digestión con ambas enzimas corresponde al plásmido linearizado (5,874 pb) (Figura 11/C-1). Los plásmidos con el inserto sí presentan ambos sitios de restricción, 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

(Figura 11/C-2). Con estos resultados se confirma gráficamente la presencia del inserto, portador de la información para la región del péptido de la porina, en los plásmidos de las cepas *E.coli* DH5a/pJAK y pJSS.

La titulación de CTB en los sobrenadantes de cultivo, utilizando el sistema GM<sub>1</sub>-ELISA (Figura 12), demuestra que la proteína PAP-CTB es funcional como CTB; debido a que es secretada al medio, se une al gangliósido GM<sub>1</sub> 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*.

El cambio en la movilidad electroforética (Figura 13) de la proteína PAP-CTB comparado con la de la CTB nativa, sugiere fuertemente la presencia del inserto (30 aa; »3,000 Da), en la CTB secretada por las cepas *E. coli* DH5a/pJAK y 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.

En el ensayo con el suero anti-porinas (Figura 14) se observa un reconocimiento específico de la PAP-CTB secretada por las clona recombinante *E. coli* DH5a/pJAK. La reactividad del suero ante los sobrenadantes de las cepas control, DH5a y DH5a/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* es reconocido por anticuerpos dirigidos contra la proteína en su forma

nativa, al ser acarreado por la CTB. 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 reconocida 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.

Ya que se disponía del péptido sintético de la región 285-303 [LQSKGKDISNGYGASYGDQ] de la porina, este se acopló a diferentes proteínas acarreadoras y se confirmó su potencial como epitopo de la porina Omp C de *S. typhi*, susceptible de ser reconocido por anticuerpos.

Los resultados que nos permiten afirmar que las construcciones pJAK267 coincide con el diseño teórico son:

- El mapeo de sitios de restricción es consistente con lo esperado.
- El cambio de movilidad electroforética de la proteína PAP-CTB comparado con la CTB nativa.
- La proteína PAP-CTB es funcional como CTB, ya que es secretada, se une al gangliósido GM1 y es reconocida por el anticuerpo monoclonal LT39, el cual es específico para la forma pentamérica de CTB.

Se ha propuesto la síntesis química de péptidos como una alternativa de generación de moléculas antigénicas bien definidas, pero esta tecnología adolece de alto costo, bajo rendimiento, métodos de purificación complejos y pobre inmunogenicidad. Esta

última puede ser mejorada mediante la conjugación química a proteínas acarreadoras con los problemas técnicos que la misma conlleva. La producción de péptidos específicos unidos a una proteína, dirigida por una molécula recombinante, nos permite obtener grandes cantidades de una población homogénea de conjugado.

Desde el punto de vista inmunológico, esta manera de expresar epitopos nos proporciona una herramienta muy poderosa para la evaluación sistemática de fragmentos antigénicos de proteínas. El hecho de que la proteína de fusión sea relativamente estable, secretada al medio y se comporte como CTB, hace posible la evaluación rápida de construcciones similares de antígenos polivalentes y su futura aplicación en la inmunización.

Se han construido otras proteínas de fusión con CTB<sup>67</sup> <sup>68</sup>. Sin embargo, para caracterizar los productos, se han tenido que movilizar los plásmidos a cepas atenuadas de *Vibrio cholerae*. El crecimiento de esta bacteria tiene más restricciones y problemas que *E. coli*. Aún cuando se han realizado experimentos piloto de fermentación hasta de 2,000 litros, el problema de la bioseguridad y el bajo rendimiento de biomasa no ha sido resuelto para *V. cholerae*. La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es bien conocida y principios activos han sido aprobados para su uso en humanos, incluyendo vacunas.

El pJAK267 puede ser un primer intento de desarrollar un sistema de producción de vacunas recombinantes capaces de evaluar inmunológicamente el péptido, ser fermentado fácilmente a gran escala y tener un sistema de purificación eficiente y rápido que puede ser empleado en una variedad de antígenos protéicos de diferentes organismos patógenos.



La proteína de fusión PAP-CTB es la primera en su serie y representa un paso importante en la creación de antígenos recombinantes duales que puedan ser empleados para analizar simultáneamente el papel protector de dos moléculas.

**- Mapeo de regiones expuesta de la porina Omp C.**

Una vez que se establecieron las secuencias de la porina Omp C de *Salmonella typhi* potencialmente antigénicas, se efectuó el mapeo de éstas regiones (L6 y L7). Los péptidos (246-254) y (285-303) sintetizados se utilizaron para inmunizar ratones de la cepa C3H/HEJ con dosis variadas de resina-péptido, en donde la resina que es un compuesto químicamente inerte cumple la función de adyuvante, con esto se asegura que la respuesta de anticuerpos sea únicamente contra las regiones específicas (Figura 8). Utilizando estos anticuerpos policlonales se comprobó que las regiones contra las cuales están dirigidos estos anticuerpos se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria (Figura 9), sin embargo, debido a la falta de especificidad obtenida con otras bacterias gram negativas fué necesaria la obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra éstas regiones<sup>69</sup>.

Se obtuvo una eficiencia de fusión elevada, se estandarizó el método de fusión, ya que al utilizar una proporción 5:1 de células de mieloma y células de bazo se obtiene un rendimiento elevado de fusión. Se realizaron 3 clonaciones con la finalidad de asegurar la clona productora, finalmente decidimos trabajar sólo con 5 clonas para cada péptido, eligiendo aquellas que nos dieron un valor elevado en el método de ELISA, obtuvimos un

incremento en los valores de absorbancia en cada una de las clonaciones realizadas, lo cual implica que efectivamente fuimos seleccionando adecuadamente la clona productora.

Al realizar el ensayo GM1-ELISA observamos que los anticuerpos monoclonales secretados por éstas clonas reconocen de manera específica a la proteína híbrida correspondiente, de tal manera que los anticuerpos anti-péptido 246 reconocen a la proteína híbrida L6/CTB secretada por la bacteria recombinante *Escherichia coli* DH 5a/PJAK y los anticuerpos anti-péptido 285 reconocen a la proteína híbrida L7/CTB secretada por la bacteria recombinante *Escherichia coli* PJP L7, algo muy importante que observamos en esta determinación es que no se hay reconocimiento hacia el loop 8 de la porina ni hacia la proteína CTB sola secretada por la bacteria recombinante *Escherichia coli* DH 5a, con éstos resultados comprobamos que los anticuerpos monoclonales obtenidos reconocen única y específicamente al péptido correspondiente y que además no hay cruce con el loop 8 de la porina, sin embargo, para establecer que efectivamente no hay cruces con otras asas de la porina es necesario efectuar también la determinación de los otros loops, sin embargo, hasta este momento no se cuenta con la construcción genética ni con la bacteria recombinante para realizarlo, lo cual será motivo de la continuación del proyecto. Este es un trabajo que se está realizando ya en el laboratorio y que en un futuro será utilizado para terminar el mapeo de las regiones expuestas de la porina Omp C de *Salmonella typhi*.(Figura 15).

Los anticuerpos monoclonales obtenidos reconocen por ELISA a las porinas obtenidas por el método de Nikaido (abs. 0.427 el anticuerpo monoclonal L6/A11 y abs. 0.327 el anticuerpo L7/F1), este reconocimiento sugiere que los determinantes antigénicos

que reconocen éstos anticuerpos se encuentran expuestos en la superficie de la bacteria y que lo propuesto por Ortiz y cols. es cierto<sup>10</sup>.

Por otra parte, al realizar el ensayo de FACS, se observa que el anticuerpo monoclonal L6/A11 (región 246-254) desplaza ligeramente la fluorescencia, con lo que se infiere que reconoce específicamente a *Salmonella typhi* y no reconoce a *Escherichia coli*, este reconocimiento específico es debido a que esta región no es compartida con *Escherichia coli*, sino que es específica de *Salmonella typhi*, por lo tanto, al no ser compartida puede tener un papel importante en la respuesta inmune específica a *Salmonella typhi*.

La unión de los anticuerpos monoclonales a estas tres formas de la porina pone de manifiesto el éxito para inducir anticuerpos con el sistema péptido-resina, ya que permite una buena exposición de la porción unida a la misma y que las regiones L6 y L7 unidas a CTB tienen un arreglo comparable con su contraparte en la proteína nativa en términos del reconocimiento por anticuerpos.

En trabajos posteriores se realizará la determinación de los diferentes isotipos, esto presenta cierta importancia para la purificación de éstos anticuerpos utilizando proteína A (IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>) debido a que la interacción del anticuerpo con ésta proteína no afecta la capacidad de reconocimiento hacia el antígeno y para saber si dichos anticuerpos tienen la capacidad de fijar complemento; de ser así, el control de la infección puede llevarse a cabo por el mecanismo antes descrito, en caso de que no tengan dicha capacidad puede proponerse otro mecanismo como la fagocitosis, o bien, realizar la búsqueda de una clona

que además de reconocer de manera específica a *Salmonella typhi*, cumpla con ésta propiedad.

Con todos estos resultados se puede concluir que las regiones 285-303 y la región 246-254 seleccionadas por algoritmos de predicción son epitopos de la porina Omp C de *Salmonella typhi* capaces de ser reconocidos por anticuerpos y además de observa que a pesar de que el péptido 285-303 tiene un tamaño pequeño (19 aa), los anticuerpos inducidos por éste son capaces de interaccionar con la proteína en su forma nativa y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos.

En 1992 Cowan y Rosenbusch detallaron la estructura cristalográfica de la porina Omp F de *Escherichia coli*; en nuestro laboratorio, Martín-Orozco (manuscrito en preparación) propuso un modelo para la estructura de la porina Omp C de *Salmonella typhi* después de alinear la secuencia de Omp F de *Escherichia coli* y de *Salmonella typhi*, se efectuó una aproximación de la estructura secundaria de la porina, se propuso que la región 246-254 se encuentra localizada en el asa L6 y que la región 285-303 se encuentra en el asa L7 encontrándose expuestas en la superficie de la membrana y estando de ésta manera accesibles al sistema inmune (Figura 4). Con base en estos datos, en estudios de la porina Omp C mediante el uso de anticuerpos policlonales y ahora con el estudio utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra esas regiones se comprueba que el modelo propuesto es válido y que las regiones predichas como epitopos se encuentran expuestas en la superficie de la porina y que de ésta manera son accesibles al reconocimiento por anticuerpos. A pesar que la predicción de éstas regiones por

algoritmos se realizó antes que se conociera en detalle la estructura de la porina la aproximación de la estructura mediante el modelo propuesto es acertada.

El obtener anticuerpos monoclonales específicos contra éstas regiones predichas como potencialmente antigénicas, reviste una importancia fundamental en el estudio de la relación huésped-parásito, ya que en trabajos posteriores se utilizarán éstos anticuerpos para efectuar experimentos de protección y para establecer si la administración pasiva de estos hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-L6 y anti-L7 inducen un estado de protección al reto con la bacteria homóloga , y de ser así, se pondrá de manifiesto la importancia que tienen las regiones L6 y L7 en la inducción de un estado de protección contra la infección por *Salmonella typhi* en el modelo murino, donde la presencia de anticuerpos específicos contra estas regiones permitiría que los componentes del complemento se fijen sobre la superficie de la bacteria y lleven a un efecto lítico .

## CONCLUSIONES

En este trabajo hemos demostrado que es posible predecir epitopos, de una proteína de membrana de *S. typhi*, la cual además puede ser alcanzada por anticuerpos inducidos contra esas regiones expuestas. Este tipo de estrategia, se puede usar para definir la topología de proteínas transmembranales cuando el análisis cristalográfico todavía no se ha podido realizar.

Las proteínas de fusión PAP-CTB se utilizaron para seleccionar anticuerpos monoclonales contra péptidos específicos de regiones expuestas de la porina OmpC de *S. typhi*. Sin embargo, el uso de otras proteínas híbridas con CTB, análogas a las reportadas aquí pueden ser útiles para seleccionar anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopos de relevancia biológica. Este procedimiento puede resultar particularmente útil cuando se producen anticuerpos en contra de secuencias inmunogénicas de virus, bacterias o parásitos los cuales son difíciles de obtener o que su manipulación implica un riesgo biológico.

## BIBLIOGRAFIA.

- <sup>1</sup> Nikaido, H., Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
- <sup>2</sup> M. S. Weiss, U. Abele, J. Weckesser, W. Welte, E. Schiltz, G. E. Schulz. 1991. Molecular Architecture and Electrostatic Properties of a Bacterial Porin. *Science* **254**:1627-1630.
- <sup>3</sup> W. Cowan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Pauptit, N. Jansonius, J. P. Rosenbusch. 1992. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**:727-733.
- <sup>4</sup> J. Kyte, R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- <sup>5</sup> T. Schirmer, S. W. Cowan. 1993. Prediction of membrane-spanning  $\beta$ -strands and its application to maltoporin. *Protein Sci.* **2**:1361-1363.
- <sup>6</sup> S. W. Cowan, J. P. Rosenbusch. 1994. Folding Pattern Diversity of Integral Membrane Proteins. *Science* **264**:914-916.
- <sup>7</sup> Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., González, C., Paniagua, J., Moreno, J. and Kumate, J. 1988 Protection against *Salmonella typhi* infection after immunization with outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect. Immun.* **56**, 2953-2959.
- <sup>8</sup> Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C.R., García, J.A. and Kumate, J. 1992 Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. *Vaccine* **10**, 811-813.
- <sup>9</sup> González, C.R., Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., García, J.A., Blanco, F., Kumate, J. 1993. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* **37**:793-799.
- <sup>10</sup> Ortiz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza, E. and 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.
- <sup>11</sup> Blanco, F., Isibasi, A., González, C.R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C., Kumate, J. 1993. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scan. J. Infect. Dis.* **25**:73-80.
- <sup>12</sup> Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M.P., Martín, N., Ramírez, G., González, C.R., López-Macias, C., Sánchez, J., Kumate, J. and Ortiz-Navarrete, V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Ac. Sci.* **730**, 350-352.
- <sup>13</sup> Jeantur, D., Lakey, J.H., Pattus, F. 1991. The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* **5**:2153-2164.
- <sup>14</sup> Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., Calva, E. 1987. Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* **61**:1867-1872.

- <sup>15</sup> Mizuno, T., Chou, M.Y., Inouye, M. 1983. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane: DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene. *J. Biol. Chem.* **258**:6932-6940.
- <sup>16</sup> Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennet, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-2. *Nature* **329**:506-512.
- <sup>17</sup> Engelhard, V.H. 1994. Estructure of peptides associated with class I and class II MHC molecules.. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:181-207.
- <sup>18</sup> Hosken NA, Bevan, MJ. 1990. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science* **248**:367-370.
- <sup>19</sup> Mellins E, Smith L, Arp B, Cotner T, Celis E, Pious D. 1990. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* **343**:71-74.
- <sup>20</sup> Falk, K., Rotzsche, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.-G. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-296.
- <sup>21</sup> Milich, D.R. 1989. Synthetic T and B cell recognition sites: implications for vaccine development. *Advan. Immunol.* **45**:195-282.
- <sup>22</sup> Townsend, A., Bodmer, H. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **7**:601-624.
- <sup>23</sup> Davies, D.R., Padian, E.A., Sheriff, S. 1990. Antigen:antibody complexes. *Ann. Rev. Biochem.* **59**:439-473.
- <sup>24</sup> Van Regenmortel, M.H.V. 1986. Which structural features determine protein antigenicity? *TIBS* **11**:36-39.
- <sup>25</sup> Benjamin, D.C., Berzofsky, J.A., East, I.J., Gord, F.R.N., Hannum, C., Leach, S.J., Margoliash, E., Michael, J.C., Miller, A., Prager, E.M., Reichlin, M., Sercarz, E.E., Smith-Gill, S., Todd, P.E., Wilson, A.C. 1984. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Ann. Rev. Immunol.* **2**:67-101.
- <sup>26</sup> Laver, G.W., Air, G.M., Webster, R.G., Smith-Gill, S.J. 1990. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* **61**:553-556.
- <sup>27</sup> Stanfield, R.L., Fieser, T.M., Lerner, R.A., Wilson, I.A. 1990. Crystal structures of an antibody to peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. *Science* **248**:712-719.
- <sup>28</sup> Jahning, F. 1990. Structure predictions of membrane proteins are not that bad. *TIBS* **15**:93-95.
- <sup>29</sup> Fasman, G.D. 1989. Protein conformational predictions. *TIBS* **14**:259-299.
- <sup>30</sup> Hoop, T.P. and Woods, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3824-3828.
- <sup>31</sup> Van Regenmortel, M.H.V. 1986. Which structural features determine protein antigenicity? *TIBS* **11**:36-39.



- <sup>32</sup> Nikaido, 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.
- <sup>33</sup> Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzimol.* 97:85-100.
- <sup>34</sup> Benz, R. y Bauer, K. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* 176:1-19.
- <sup>35</sup> 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.
- <sup>36</sup> 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.
- <sup>37</sup> Overbecke, 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.
- <sup>38</sup> 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: Caffedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. y Jaz, J. (Eds.) Cell function and disease. Plenum Press. N.Y. págs:281-292.
- <sup>39</sup> Paniagua, J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz, V., Muy, M., González, C., García, J.A., Islas, S. y Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12, Vi:d: análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 20:315-320.
- <sup>40</sup> Vinali, D.A.A., Strominger, J.L. 1994. Coreceptor function and the characteristics of MHC-bound peptides. A common link?. *The Immunologist* 2:112-118.
- <sup>41</sup> Colman, P.M., Laver, W.G., Varghese, J.N., et al. 1987. Three dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. *Nature* 326:358-363.
- <sup>42</sup> Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J. 1986. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23:709-715.
- <sup>43</sup> 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.
- <sup>44</sup> Karplus, M. y McCammon, A. 1983. Dynamics of proteins: elements and function. *Ann. Rev. Biochem.* 53:263-300.

- <sup>45</sup> 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.
- <sup>46</sup> Agüero, J., Mora, G., Mroczenski-Willey, M.J., Fernández-Beros, M.E., Aron, L., Cabello, F.C. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 Kda *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogen.* **3**:399-407.
- <sup>47</sup> Merrifield, R.B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149-2154.
- <sup>48</sup> Atherton, E., Clive, D.L.J. y Sheppard, R.C. 1975. Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* **97**:6584-6585.
- <sup>49</sup> 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.
- <sup>50</sup> Atherton, E., Logan, C.J. y Sheppard, R.C. 1981. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using *N*-fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J.C.S. Perkin I*:538-546.
- <sup>51</sup> Fisher PM, Comis A, Howden MEH. 1989. Direct immunization with synthetic peptidyl-polyamide resin. *J. Immunol. Methods* **118**:111-123.
- <sup>52</sup> Engvall, E. y Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**:871-874.
- <sup>53</sup> Sánchez, J., Svennerholm, A.M., Holmgren, J. 1988. Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. *FEBS Letters* **241**:110-114.
- <sup>54</sup> Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. pp. 1.25-1.39. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
- <sup>55</sup> Hanahan, D. 1983. Studies on the transformation of *Escherichia coli* *J. Mol. Biol.* **166**:557.
- <sup>56</sup> Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- <sup>57</sup> Svennerholm, A.M., Holmgren, J. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA). *Curr. Microbiol.* **1**:19-23.
- <sup>58</sup> Kohler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.

- <sup>59</sup> Kohler, G., Milstein, C. 1976. derivation of specific-antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6:511-579.
- <sup>60</sup> Baron, D. 1992. Production of Hybridomas. En: Monoclonal antibodies. (Peters, J.H. and Baumgarten, H., Eds.), pp. 137-222. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. Alemania.
- <sup>61</sup> Paniagua-Solis, J., Martín-Orozco, N., Ortiz-Navarrete, V., Ramírez, G., González, C.R., Isibasi, A. 1995. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Immunol. Infect. Dis.* 5:244-249.
- <sup>62</sup> 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.
- <sup>63</sup> 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.
- <sup>64</sup> 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.
- <sup>65</sup> 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.
- <sup>66</sup> González García-Conde, R. 1992. Fusión de un epítotope de neutralización de rotavirus a la subunidad B de la toxina de cólera. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Mor. U.N.A.M.
- <sup>67</sup> Dertzbaugh, M.T., Peterson, D.L., Macrina, F.L. 1990. Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structural and functional analysis of the chimeric protein. *Infect. Immun.* 58:70-79.
- <sup>68</sup> L'hoir, C., Renard, A., Martial, J. 1990. Expression in *E. coli* of two mutated genes encoding the cholera toxin B subunit. *Gene* 89:47-52.
- <sup>69</sup> Paniagua-Solis, J., Sánchez, J., Ortiz-Navarrete, V., González, C.R., Isibasi, A. 1996. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* OmpC peptide loops. *FEBS Microbiol. Letters.* (En prensa).