

11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**PURIFICACION Y PREDICION DE DETERMINANTES
ANTIGENICOS Y DE ESTRUCTURA SECUNDARIA, EN LA
HEMAGLUTININA - NEURAMINIDASA DEL
PARAMYXOVIRUS PORCINO DE LA PIEDAD MICHOACAN**

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INMUNOLOGIA**

P r e s e n t a:

ROBERTO / ZENTENO CUEVAS

Asesor: Edgar Zenteno Galindo

México, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Medicina

Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas

Inmunología

***Purificación y predicción de determinantes antigénicos y de estructura secundaria, en la
Hemaglutinina-Neuraminidasa del Paramyxovirus Porcino de la Piedad
Michoacán.***

Presenta: Roberto Zenteno Cuevas.

Tutor : Edgar Zenteno Galindo.

México D.F., Ciudad Universitaria , Abril 1997

Imagen del sabio nahuatl

El sabio: una luz, una tea,
Una gruesa tea que no ahúma
Un espejo horadado,
un espejo agujereado por ambos lados.
Suya es la tinta negra y roja,
de él son los códices, de él son los códices.
El mismo es escritura y sabiduría.
Es camino, guía veraz para otros.
Conduce a las personas y a las cosas,
es guía en los negocios humanos

El sabio verdadero es cuidadoso
y guarda la tradición.
Suya es la sabiduría transmitida,
él es quien la enseña,
sigue la verdad
no deja de amonestar.

Hace sabios los rostros ajenos,
hace a los otros tomar una cara [una personalidad]
los hace desarrollarla
Les abre los oídos, los ilumina.
Es maestro de guías,
les da su camino,
de él uno depende.
Pone un espejo delante de los otros,
los hace cuerdos, cuidadosos,
hace que en ellos aparezca una cara [una personalidad]

Se fija en las cosas,
regula su camino,
dispone y ordena.
Aplica su luz sobre el mundo.
Conoce lo [que está] sobre nosotros
[y], la región de los muertos.

Cualquiera es confortado por él,
es corregido, es enseñado.
Gracias a él la gente humaniza su querer
y recibe una estricta enseñanza.
Conforta el corazón
conforta la gente,
ayuda, remedia,
a todos cura.*

*Codice Matritense (1500) de la Real Academia vol. VIII fol 118r

A todos aquellos que me han seguido demostrando la existencia de un espíritu libre y de que la sabiduría es universal y atemporal.

Abril-1997.

I Resumen	5-6
II Generalidades	7
El paramixovirus porcino de la piedad Michoacán	8-10
Bacterias como acarreadores de epitopes heterologos	10-11
Las porinas y su utilización como proteínas recombinantes	12-13
Predicción de estructuras secundaria y epitopes	13-14
II Objetivos	15
III Material y Métodos	
De las Predicciones, estructural, fisicoquímica, alineamiento Múltiple y variabilidad	16-20
Predicción de Epitopes, su síntesis y Elisa de los mismos	20-21
Biología Molecular obtención de la proteína de Fusión OmpC-HNA	21-25
Ligación al vector de expresión y transformación celular	25-27
Evaluación de la producción de la proteína por PAGE	27-28
Evaluación de la producción de la expresión de la proteína en la superficie por FACS	28
Evaluación de la producción de anticuerpos anti HN a partir de la inmunización con la bacteria E. coli conteniendo a la proteína de fusión	28-29
Inhibición de la actividad Hemaglutinante del virus LPM	29-30
IV Resultados	
De la predicción de Estructura secundaria y Propiedades Fisicoquímicas	31-34
Del alineamiento múltiple y análisis de variabilidad	34-41
De la predicción de epitopes antigénicos	42-44
De la inclusión del péptido A en el Asa 5 de la porina OmpC	45-46
Producción y expresión de la proteína recombinante OmpC-HNA	47-48
Generación de anticuerpos antipéptido A con la proteína de recombinante	48-50
Inhibición de la actividad Hemaglutinante	50-51
V Discusión	52-58
VI Conclusiones	59-60
VIII Referencias	61-70

I RESUMEN

El rubulavirus porcino de la Piedad Michoacán (LPM), es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul, responsable de una gran mortalidad en lechones, y de daños neurológicos y reproductivos en cerdos adultos.

Una de las proteínas más importantes del rubulavirus LPM es la proteína de superficie Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN), implicada en mecanismos de reconocimiento e interacción con el receptor en la célula blanco. Muchos aspectos importantes de esta proteína se desconocen por lo que en este trabajo de tesis se realizó la caracterización teórica de la estructura secundaria, algunas propiedades fisicoquímicas así como la identificación de epítopes de B utilizando la combinación de varios algoritmos. Los resultados muestran que esta proteína se encuentra organizada en tres regiones 1) Intracelular, del aminoácido 1 al 25; 2) Transmembranal del residuo 26 al 47, típicamente hidrófoba rígida e inaccesible al solvente y 3) Extracelular, de los residuos 48 al 576, la cual contiene las funciones de Hemaglutinación y Neuraminidasa, y que en términos generales muestra una organización predominantemente Beta-Asa-Beta con pocas alfa hélices.

Se definieron dos péptidos antigénicos, uno del residuo 533 al 544 con la secuencia TTTCFRDITDTGK (péptido A), otro del residuo 251 al 267 con la secuencia YVATRSETDYYAGNSPPQ (péptido B) y finalmente se consideró un péptido no predicho como antigénico por ninguno de los sistemas empleados, del residuo 315 al 325 con la secuencia PAYGGMQQILA (péptido C). Mediante la técnica de ELISA se observó que el péptido B fue reconocido por anticuerpos provenientes de suero de cerdo infectado experimentalmente con LPM, en contraposición con el péptido C el cual mostró poco nivel de reconocimiento, lo que comprueba la eficiencia de la predicción. Para evaluar el potencial inmunogenico del péptido A se planteó un sistema de expresión en la proteína de membrana externa OmpC de Salmonella typhi, sustituyendo el asa 5 de la OmpC original, por el péptido A. La proteína recombinante resultante OmpC-HNA mostró una buena producción y expresión en la superficie bacteriana, así como una buena generación de anticuerpos anti LPM al inmunizar con la bacteria completa.

Nuestros resultados nos permiten sugerir que la utilización de un sistema combinado de predicción de estructura secundaria y de epitopes antigénicos incrementa grandemente la eficiencia y certidumbre de los procedimientos teóricos. Además las perspectivas de utilización para la proteína recombinante obtenida en este trabajo como un sistema de inducción eficiente de anticuerpos contra la proteína HN se definen como atractivas, por lo que la elaboración de una vacuna utilizando este sistema para el rubulavirus LPM se consideran potencialmente viables.

4/2/2010

II GENERALIDADES

El paramixovirus porcino.

El paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (LPM) es responsable del síndrome del ojo azul en cerdos (Moreno-López *et al.*, 1986). Los primeros casos de la enfermedad se presentaron durante 1979 en granjas de La Piedad Michoacán (Stephano *et al.*, 1981). Para 1980 se reportaron brotes de la enfermedad en los estados de Jalisco y Guanajuato, en 1983 en el Distrito Federal, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala y Querétaro (Stephano y Gay, 1985), expandiéndose hasta Puebla y Campeche (Carreón *et al.*, 1989). A pesar de que esta enfermedad se continúa difundiendo en todo el país, el foco principal sigue siendo La Piedad Michoacán y regiones como Jalisco y Guanajuato, entidades que cuentan con una densa población porcina. Hasta hace poco se creía que México era el único país afectado con esta enfermedad, recientemente se han descrito nuevos casos en Estados Unidos (Fuentes *et al.*, 1990).

Aspectos Biológicos:

Por sus características biológicas, estructurales, morfológicas y genómicas el virus LPM ha sido clasificado dentro del género Paramixovirus. Los viriones de los paramixovirus son esféricos, pleomórficos y miden de 100 a 360 nm. Su nucleocápside es helicoidal y está incluida en una membrana lipoprotéica extremadamente frágil derivada de la célula infectada, y su ausencia deja al virión vulnerable a la destrucción por mecanismos simples como el almacenaje y descongelamiento. El paramixovirus LPM como todos los paramixovirus contiene una nucleocápside con una copia sencilla de RNA viral de cadena negativa de 14 Kb, el cual codifica para 6 proteínas diferentes, 4 de ellas asociadas al RNA, que forman la nucleocápside (Murphy *et al.*, 1996): la Fosfoproteína (P) con 52 KDa, y la proteína de alto peso molecular (L) con 200 Kda. Ambas forman un complejo implicado en la replicación del RNA; la Nucleoproteína (NP), quien al parecer posee una función meramente estructural. Finalmente se encuentra la proteína de matriz (M) de 40 KDa también en el interior de la envoltura, cuya función principal consiste en dirigir la nucleocápside a las zonas de la membrana de la célula infectada donde se localizan gran cantidad de glicoproteínas virales, también se cree que esta proteína M posee un papel importante en la regulación de la síntesis del ARN viral.

Proteínas de Superficie.

La nucleocápside viral se encuentra cubierta por una membrana lipídica proveniente de la célula huésped, y ésta contiene dos proteínas de suma importancia en la biología del paramixovirus: La proteína de Fusión (F), de 59 KDa, que participa en la asociación del virus a la membrana para posterior fusión de la envoltura viral y la membrana celular, con la consecuente penetración a la célula. Además esta proteína es la principal responsable de la fusión con células aledañas formando los "sincicios" y, en consecuencia, de la extensión de la infección en el área local. Finalmente, se encuentra la Hemaglutinina Neuraminidasa (HN) la cual, al igual que la F, se asocia en dímeros y tetrámeros unidos por puentes disulfuros. Se ha observado la existencia de dos dominios funcionales en la misma proteína, uno con actividad neuraminidasa, responsable de la eliminación de grupos de ácido siálico y otro dominio con actividad hemaglutinante. La actividad neuraminidasa permite un acercamiento con estructuras celulares como receptores secundarios, y el dominio neuraminidasa reconoce y une específicamente estructuras sacarídicas en la superficie de la célula blanco. La caracterización molecular de la HN es reciente (Sundqvist *et al.*, 1990, y Linné *et al.*, 1992), el gene tiene 1906 nucleótidos de longitud, y 576 aminoácidos, con un peso molecular de 63.3 kDa, con 4 sitios potenciales de N-glicosilación y una región altamente hidrofóbica cerca del N-terminal, sugiriendo que es un dominio de anclaje a membrana. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína HN con otros paramixovirus reveló una gran similitud con el virus simico principalmente, el virus de las paperas y del sarampión (Sundqvist, 1992). Sin embargo, se ha propuesto recientemente que el virus LPM sea reclasificado junto con los virus SV5 (virus simico), parotiditis, ParaInfluenza-2 y ParaInfluenza-4 dentro de un nuevo género de la familia paramixoviridae, llamado Rubulavirus (Murphy *et al.*, 1996). Esta proteína tiene la capacidad de aglutinar y lisar eritrocitos de una gran variedad de mamíferos y aves, debido a la presencia de actividad neuraminidasa y aglutinante. Trabajos previos han demostrado que la especificidad patogénica del LPM es debida a la capacidad de la proteína HN para reconocer específicamente estructuras conteniendo α 2,3 sialil lactosa en los órganos blanco como el tracto respiratorio, sistema nervioso y epididimo (Reyes *et al.*, 1993).

Caracterización Estructural de la Proteína HN.

Hasta la fecha, se han realizado muchos esfuerzos para caracterizar estructuralmente y entender la bifuncionalidad de las proteínas HN de otros paramixovirus, utilizando diversas técnicas, tales como algoritmos teóricos (Blumberg *et al.*, 1985), correlación estructural con otras secuencias y con otras proteínas (ej. la Neuraminidasa de Influenza) (Colman *et al.*, 1993), evaluación estructural utilizando anticuerpos monoclonales (Yewdell y Gerhard, 1982, Portner *et al.*, 1987; Deshpande y Portner, 1984, 1985), dicroísmo circular (Baiocchi *et al.*, 1993), y cristalización de la proteína para estudios de cristalografía de rayos X (Murti *et al.*, 1993, Takimoto, 1992). Sin embargo y a pesar de todos estos esfuerzos muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas HN de los paramixovirus en general, y del virus LPM, son desconocidos.

Características clínicas del LPM.

Hay evidencias que indican que la ruta natural de infección es la nasofaringe, ya que la inoculación experimental intranasal o intratraqueal en lechones de un día de edad, provocan un síndrome similar a la infección natural (Stephano y Gay, 1983). El sitio inicial de replicación se localiza en la mucosa nasal y amígdalas, de donde se traslada al sistema nervioso y pulmones (Stephano y Gay, 1985).

Este virus induce alteraciones reproductivas y nerviosas en cerdos adultos y altos niveles de mortalidad en lechones (Stephano *et al.*, 1981). Durante un brote de la enfermedad la morbilidad es del 20%, y la mortalidad del 90%, siendo los más susceptibles los lechones menores a 20 días de edad. Los signos clínicos varían de acuerdo a la edad de los animales, en lechones se caracteriza por una rigidez en los miembros posteriores, temblor muscular y movimientos involuntarios típicos de una infección del sistema nervioso central, falleciendo a las 48 hrs posterior a la aparición de los primeros signos observados. Los cerdos mayores de 30 días muestran poco daño neurológico y solo algunos mueren por la infección, a menos que se encuentre asociada con alguna otra enfermedad. Las principales manifestaciones son de tipo reproductivo, en hembras preñadas se presenta un retroceso a estro, momificaciones fetales y un incremento en el número de lechones muertos al nacer, en los machos se han reportado alteraciones como, orquitis, epididimitis y atrofia testicular,

(síntomatología similar a la parotiditis humana) (Pomeroy y Jordan, 1992) Es por todas estas razones que esta enfermedad tiene una repercusión importante en la economía de los porcicultores.

Respuesta inmune contra LPM.

La información relacionada a la inmunidad en el síndrome del ojo azul en términos generales es escasa, algunos datos, como la limitación de la enfermedad en una zona de brote (Stephano y Gay, 1985), y la identificación en animales convalecientes de títulos altos de anticuerpos por períodos prolongados, indican la existencia de un proceso de respuesta de anticuerpos contra el virus. A pesar de las similitudes genéticas y estructurales existentes, el virus LPM no comparte determinantes antigénicos importantes con otros paramixovirus, ya que los sueros hiperinmunes contra Parainfluenza 1, 2 y 3, sarampión, parotiditis, virus sincicial respiratorio humano, bovino y virus de la enfermedad de Newcastle no reaccionan con LPM tal como se determinó por pruebas de neutralización inmunofluorescencia, fijación del complemento, doble inmunodifusión e inhibición de la hemaglutinación (Martínez *et al.*, 1985; Moreno Lopez *et al.*, 1986).

En la caracterización antigénica de varios paramixovirus se han identificado epitopes secuenciales y conformacionales en la proteína HN, incluso se han reportado la elaboración de anticuerpos monoclonales específicos para estas regiones, con una buena actividad bloqueadora de la función neuraminidasa y/o hemaglutinina, y con aplicación terapéutica, lo que sugiere que la HN es una de las mejores proteínas capaces de generar una respuesta inmunológica. Este aspecto podría ser considerado como lógico al suponer su abundancia, localización y las primeras en reconocer el carbohidrato de la célula a infectar. Si bien hasta el momento no existe vacuna comercial contra síndrome del ojo azul, han sido reportadas algunas vacunas que han mostrado buenos resultados en la prevención de la enfermedad experimental.

Bacterias acarreadoras de antígenos heterólogos y su aplicación como vacunas.

En los últimos 10 años, se ha desarrollado una nueva línea de investigación para vacunas experimentales que consisten en el uso de bacterias vivas o atenuadas como vehículos o portadores de antígenos extraños, los cuales son expresados a partir de un vector que contiene el o los genes correspondientes (Hofnung, 1991; Everest *et al.*, 1995).

De los vectores utilizados principalmente se pueden mencionar a LamB (proteína de membrana externa) y MalE (proteína periplásmica), en donde se ha realizado la inserción del principal

péptido neutralizante de VIH (Charbit, 1993), o la inserción en la proteína MalE del péptido neutralizante C3 del poliovirus tipo 1 y de la región PreS2 del virus de la hepatitis B (Leclerc, 1990), utilizando en ambos casos la bacteria *Escherichia coli* como acarreadora y observando una buena respuesta inmune contra el péptido heterólogo por medio de ELISA e inmuno electroforesis.

La ventaja de este sistema donde las bacterias funcionan como "acarreadores vivos y constitutivos" es que resulta un método eficaz para la administración de antígenos "heterólogos" y que la creación de una proteína recombinante resultante es un proceso similar a la asociación de un péptido sintético acoplado a su proteína acarreadora, excepto que gracias a la construcción genética, el péptido es parte de la continuidad de la proteína, de manera que esta se puede expresar en una bacteria acarreadora y la presentación del péptido heterólogo es entonces constitutiva y sin modificaciones substanciales en las generaciones posteriores. Sin embargo para que estas cepas Bacterianas pueda ser empleadas como acarreadores, se deben utilizar como vectores a plásmidos que confieren resistencia a antibióticos, lo que trae como consecuencia la retención del plásmido por la bacteria, o incorporar el gene recombinante al cromosoma de la bacteria acarreadora (Cardenas y Clements, 1993). Una de las ventajas en la utilización de estos "vectores vivos" es que pueden producir una o varias proteínas recombinantes en cantidades considerables y al mismo tiempo inducir protección en el organismo que la recibe, pues la administración de las bacterias acarreadoras por vía oral puede inducir respuesta inmune tanto humoral como mediada por células contra la bacteria y, consecuentemente el antígeno que acarrea lo que finalmente confiere un cierto grado de protección.

Proteínas de Membrana Externa en bacterias (PMES:Porinas).

La cubierta de una Bacteria Gram negativa posee una membrana interna y otra externa, entre las cuales se encuentra una capa acuosa, el periplasma. En la membrana externa cerca del 50% por ciento de la masa total es proteína y esta a su vez se encuentra organizada por elementos porínicos y no-porínicos. Los elementos porínicos muestran una concentración de aproximadamente de 10^3 copias por bacteria y un 2% de la proteína total, se han denominado así por su tendencia de arreglarse en trimeros que se ensamblan en el periplasma y se incorporan a la membrana externa, formando poros o canales por los cuales se regula la entrada pasiva e inespecífica de pequeñas moléculas hidrófilicas a través de la membrana externa (Nikaido *et al.*,

1987) estos elementos tienen un peso que oscila entre 36 y 38 KDa, y su composición de aminoácidos les proporciona una moderada hidrofobicidad, un índice de polaridad del 45%, y un punto isoeléctrico de entre 4.5-4, lo que les confiere una gran estabilidad en presencia de detergentes, sales biliares y SDS, además de una alta resistencia a la acción de algunas proteasas (Nikaido, 1983).

Las porinas identificadas hasta el momento tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium* son OmpC, PhoE, OmpF, NmpA, NmpB, NmpC, LamB y, sólo en *S. typhimurium* OmpD, cuyas secuencias y estructuras al parecer son muy semejantes entre sí y tan sólo difieren en su selectividad y afinidad por grupos iónicos (Overbeeke, 1983).

Características Estructurales y la unidad estructural de las Porinas.

Estudios cristalográficos realizados en OmpF y PhoE de *E. coli* a una resolución de 2.4 y 3.0 Å respectivamente, muestran que la unidad estructural es un barril con un promedio de 336 residuos formado por 16 hojas beta antiparalelas unidas entre sí por giros y asas largas, interrumpido en algunas ocasiones por alfa hélices de pequeña longitud. A la mitad de la proteína, se localiza la zona de restricción la cual se produce por una reducción del diámetro del poro y determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad (Cowan, *et al* 1992).

Inmunogenicidad de las porinas.

Se ha observado que las porinas poseen un papel importante en la inducción de una respuesta inmune contra la fiebre tifoidea, y que la mezcla de proteínas de membrana externa así como de los elementos puros poseen epitopos para células T y B capaces de inducir respuesta inmune local y sistémica de una manera eficiente y segura al activar macrófagos, complemento y consecuentemente inducir protección en modelos animales. También se ha demostrado que las porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*, son capaces de inducir proliferación *in vitro* de linfocitos de ratones NIH inmunizados con Proteínas de Membrana Externa y es independiente de la presencia de Lipopolisacáridos (González, 1993).

OmpC y la selección de la proteína de Fusión.

La proteína OmpC de *Salmonella typhi* es una porina bien caracterizada, al secuenciarse el gene (Venegas *et al.*, 1988) y observarse la existencia una gran similitud en la secuencia de aminoácidos con la porina OmpF (Jeantur *et al.*, 1991), información que ha permitido incluir a esta proteína en un vector de expresión y expresarla en *E. coli* (Agüero, 1987) Reportes

recientes indican que la OmpC recombinante por si misma es capaz de inducir una protección del 30% al reto con 100 LD50 de bacteria viva (Isibasi *et al.*, 1994), incluso se han identificado a las asas externas 5, 6 y 7, como las principales responsables de generar un alto nivel de inmunogenicidad e inducción de la respuesta inmune (Paniagua, 1995).

Por todos los datos anteriores nos permitimos proponer la utilización de la proteína OmpC de *Salmonella typhi*, como un candidato a proteína receptora de péptidos heterólogos, debido a que se conoce de antemano por homología su estructura tri-dimensional, su inmunogenicidad y, cuáles serían las regiones que se sustituirían, así como las condiciones de purificación de las misma en condiciones naturales y de sobreexpresión. De manera interesante no se han identificado reportes previos donde se proponga la utilización de OmpC como una proteína aceptora de péptidos recombinante, por lo que los datos que se obtengan podrian originar nuevas líneas y métodos a seguir para la utilización de esta proteína como un vector de antígenos heterologos.

La predicción de estructura y de epítopes antigénicos.

Mucho se ha mencionado y discutido sobre la efectividad, el valor y la trascendencia de la predicción de la estructura secundaria en un proteína determinada. En la actualidad dos grandes líneas están dirigidas a resolver este problema: 1) Por medio de programas que permiten predecir estructuras secundarias, los cuales han incrementado el valor predictivo hasta cerca de un 80%, al utilizar como fundamentos teorías de redes neurales, inteligencia artificial y sistemas de entramado, pero fundamentados casi todos en información proveniente de estructuras cristalográficas determinadas previamente. 2) Por medio de modelado, el cual permite construir la estructura terciara a partir de únicamente la secuencia de amino ácidos, siempre y cuando exista una proteína de referencia previamente cristalizada y cuya secuencia de amino ácidos sea bastante homóloga a la proteína problema. Los resultados obtenidos de cualquiera de las dos predicciones generan información fundamental para entender la funcionalidad, propiedades y requerimientos de la proteína, información que se acrecienta grandemente cuando se suman a estas determinaciones otros parámetros, como posible asociación a membrana o accesibilidad al medio. Esto podria dar como finalidad una idea de su empaquetamiento, condiciones de plegamiento o de estabilidad en diversos solutos, siendo entonces la única limitante el poseer la secuencia de amino ácidos (revisión en Böhm, 1996)

En comparación los sistemas de predicción de epitopes se han desarrollado menos espectacularmente que los anteriores. Si bien el desarrollo de los sistemas de predicción de epitopes, basados en las frecuencias de ocurrencia de ciertos aminoácidos en péptidos antigénicos determinados experimentalmente mostró cierto avances, este se ha detenido sin grandes mejoras en las predicciones, siendo los mayores avances para la predicción de epitopes de T, debido a su "relativamente fácil" purificación y secuenciación a partir de complejos péptidos-MHC (Horsfall *et al.*, 1991). Se puede entonces concluir que las ventajas en la utilización de algoritmos de predicción de péptidos de B, es que se delimita el espacio de búsqueda y restringe los trabajos a uno o dos péptidos, evitando así la síntesis y análisis de gran cantidad de ellos y trabajar sólo con aquellos con mayor potencialidad.

II OBJETIVOS :

- Caracterizar la estructura secundaria, la accesibilidad, flexibilidad e hidropatía de la proteína HN del paramixovirus porcino.
- Mediante la utilización de algoritmos teóricos identificar epítopes lineales de B en la proteína HN del paramixovirus porcino.
- Evaluar la eficiencia de la predicción por medio del reconocimiento de los epítopes propuestos, utilizando anticuerpos de cerdo infectados experimentalmente con el virus LPM.
- Construir la proteína recombinante OmpC de *Salmonella typhi* -péptido A de LPM, evaluar su correcto ensamblado y expresión en la superficie de la bacteria *Escherichia coli*.
- Evaluar la eficiencia del sistema recombinante en la generación de anticuerpos específicos contra el péptido identificado como inmunógeno, al inmunizar con la bacteria acarreadora de la proteína recombinante

III MATERIAL Y MÉTODOS

Caracterización Estructural.

Se utilizaron Cinco algoritmos teóricos diferentes para predecir a la estructura secundaria en la secuencia de amino ácidos de la proteína HN de LPM previamente publicada (Sundqvist *et al* , 1992).

1) Chou y Fasman (1974), algoritmo basado en el calculo de parámetros conformacionales a partir de frecuencias de amino ácidos observadas en proteínas y con una estructura bien conocida, este método posee una exactitud de 57%.

2) Garnier *et al* (1987), fue usado considerando los parámetros para un grupo de 26 proteínas con una estructura tri-dimensional conocida y usando el algoritmo de teoria de información, con probabilidad condicionada.

$$I(k,i) = \ln [P(k/i) / P(k)]$$

donde: k = designa el estado (α hélice, Hoja β o giro, Asa)

$P(k/i)$ = es la probabilidad del estado k conociendo el amino ácido (aa) i

$P(k)$ = la probabilidad del estado k .

$I(k,i)$ = es la información que aa i comporta en el estado k . Las constantes de decisión optimizadas fueron fijas de acuerdo a los autores.

3) Deleage & Roux (Método de doble predicción, 1987) este programa permite la predicción de la estructura secundaria en 4 pasos: a) Predicción de la clase estructural de la proteína a partir de la composición de amino ácidos b) Estimación preliminar de la estructura secundaria con un algoritmo sencillo c) Comparación entre dos predicciones independientes y d) Optimización de los parámetros y re-predicción de la estructura secundaria. Los parámetros de la predicción de la estructura secundaria han sido determinados a partir de un grupo de 60 proteínas con una estructura tridimensional conocida y utilizando la siguiente fórmula

$$P(k,i) = P(k) \cdot P(i)$$

donde: k = designa el estado (α hélice, Hoja β o Giro, Asa)

$P(k,i)$ = es la probabilidad del estado k para aai.

$P(k)$ = es la frecuencia del estado k .

$P(k,i)$ es el parámetro de aa i para el estado k . Este programa tiene una confiabilidad del 61% al 72%

4) Levin *et al.*, 1986, este programa permite la predicción de la estructura secundaria identificando similitudes con otras proteínas cuya estructura secundaria y tridimensional son conocidas. Cada segmento de residuos es comparado con todos los segmentos de la misma longitud de todas las proteínas de la base de datos de Kabsch y Sander, y muestra una exactitud del 62.2%.

5) El método de Rost y Sanders o PHD (versión 5.94-317) usa un procedimiento de red neural de tres capas (Rost y Sanders, 1993, 1994, 1994b), donde un juicio de decisión promedia varias redes independientemente entrenadas produciendo la asignación final. Este método agrupa las ocho clases de estructura secundaria definidas por DSSP (Kabsch y Sander, 1983) dentro de tres hiperclases: H, hélice, (α , 3_{10} , π); E, Hebra β -extendida y C, giro, asa, puente- β y estructuras no periódicas; este método posee un porcentaje de exactitud del 72% en un grupo de 250 secuencias únicas con estructura conocida, este análisis fue hecho por el servidor de correo electrónico (Rost y Sander, 1994).

De las predicciones hechas con cada uno de los algoritmos, la estructura secundaria consenso se obtuvo considerando las siguientes restricciones en cada residuo: 1) Cuando tres diferentes algoritmos consideren a un residuo con la misma estructura, 2) para regiones predichas como alfa hélice, fue necesario identificar al menos seis residuos consecutivos asignados con dicha conformación. Del mismo modo cuatro residuos fue la longitud mínima necesaria para determinar una Hebra-beta y tres residuos para la determinación de una asa; 3) cuando se originaron dudas en la definición, fue considerada la influencia de los residuos adyacentes; 4) discrepancias entre los diferentes métodos acerca de la longitud de cada segmento de alfa hélice fue corregida por inspección, tomando en cuenta las preferencias de localización de aminoácidos al final de los segmentos (Richardson y Richardson, 1988) y 5) la estructura Asa, fue considerada cuando tres algoritmos definieron al mismo residuo con una estructura giro o aleatoria (sin estructura definible), o cuando muchas indecisiones se originaron en la definición (la predicción exacta de estructuras giro o aleatoria fue excluida, debido al gran número de residuos que tenían que ser analizados). La justificación para la utilización de varios algoritmos para predecir la estructura

secundaria se debe a que por este sistema se incrementa significativamente la exactitud de la predicción en varios puntos (Deleage y Roux, 1989; Chou, 1989).

Análisis de reconocimiento de plegamiento de la proteína.

Con la finalidad de evaluar la coherencia de nuestra predicción se realizó la comparación con el programa TOPITS, incluido dentro de una nueva serie de métodos para la predicción de la estructura secundaria, basados en la observación de que a menudo ciertas secuencias adoptan una estructura tridimensional aun sin la existencia de una homología con la secuencia problema. La idea de este método es combinar una secuencia con una estructura de una manera óptima, proceso referido como "entramado". (Rost *et al.*, 1995) se utilizó por medio de servicio de correo electrónico y la base de datos fue el Protein Data Bank, y la versión # 77, Julio 1996.

Caracterización Físicoquímica.

Para caracterizar algunas propiedades físicoquímicas de la proteína HN, tres diferentes algoritmos teóricos fueron utilizados: 1) Flexibilidad determinada por el método descrito por, Karplus y Schulz (1985), basado en las escalas de factores de temperatura conocidos de los carbonos- α de proteínas con estructura conocida, 2) Hidropatía determinada como Kyte y Doolittle (1982), promediando el índice de hidrofobicidad de cada amino ácido individual, se considero en ambos algoritmos una ventana de 11 residuos y 3) Accesibilidad al solvente, la cual fue calculada como describe Kabsch y Sander's (1983).

Análisis de Regiones Transmembranales.

La posible región transmembranal se realizó por el consenso de tres algoritmos: Eisenberg *et al.*, (1984), Roa y Argos, (1980) y Klein, (1985). Los resultados fueron combinados con las propiedades físicoquímicas obtenidas anteriormente y solamente aquellas regiones definidas con los tres programas fueron considerados como transmembranales.

Detección de patrones y firmas en la secuencia.

La versión del diccionario PROSITE No21-1995 (Bairoch, 1990) se utilizó con la finalidad de encontrar residuos con potencial significancia biológica.

Proceso de Alineamiento.

Veinticinco secuencias de aminoácidos de HN de varios paramixovirus fueron alineadas usando el programa CLUSTAL (Higgins y Sharp, 1989), considerando una falla de gap de 5 en la

similitud en los pares y un costo de un gap abierto de 10 para el alineamiento final. Las siguientes secuencias HNs fueron consideradas: LPM (número de acceso S77541), de la Base de Datos GenBank, (1996); 3 secuencias del virus paperas mumps: Mump1 (P19762), Mumpm (P11235), Mumpn (P10866), 9 secuencias del virus Newcastle: Ndvbc (P32884), Ndv (P35740), Ndvh4 (P12559), Ndvi (P12556), Ndvjcp (P35742), Ndvm (P12557), Ndvq (P13850), Ndvgt (P12553), Ndvi (P12558), 5 secuencias del virus de parainfluenza: Pi2h (P25465), Pi2ht (P25466), Pi3b (P06167) Pi3ht (P12562), Pi3hu (P12563), 2 del virus sendai: Sendh (P03425), Sendz (P04853), y 5 del virus simico Sv41 (P25180), Sv5 (P04850), Sv5cm (P28883), Sv5cp (P28884), Sv5ln (P28885), todas fueron obtenidas de la base de datos Swiss-Prot database 1996. Ninguna modificación manual fue hecha en el alineamiento final. Casi todas las predicciones fueron realizadas con el paquete de análisis de secuencias (ANTHEPROT) versión 5.5 (Deleage, 1988) y versión V2.3 para windows.

Análisis de Variabilidad.

La utilización de los análisis de variabilidad históricamente se ha desarrollado a dos líneas. Una de ellas que es la tradicional, donde a partir de secuencias de proteínas similares, con funciones de reconocimiento de diversos elementos, se localizan las regiones implicadas en tales procesos, un ejemplo clásico lo constituyen las moléculas de los anticuerpos (Wu y Kabat, 1970). Y por otra es la localización en secuencias de amino ácidos de proteínas sumamente conservadas de regiones con altos valores de variabilidad, cuya función principal es la de originar diversidad antigénica, lo que le permite a esa proteína en particular evadir la respuesta inmune, un ejemplo es la identificación de las regiones variables de la proteína gp120, del virus VIH, y que le permiten evadir el reconocimiento por anticuerpos y linfocitos B (Hansen, 1996).

Como se comentó previamente las proteínas más importantes en generar una respuesta inmunológica en otros paramixovirus son las proteínas HN y F, y nuestros análisis de alineamiento múltiple, y de patrones nos permitió observar que existe una gran similitud en las diferentes secuencias HN, por lo que sería muy posible identificar a las regiones posiblemente implicadas en la variabilidad antigénica, y por otra la localización dentro del dominio hemaglutinina de los posibles amino ácidos implicados en el proceso de reconocimiento al carbohidrato, que son aparentemente especie específicos

Se utilizó entonces el programa VIR (Almagro, 1995) en donde se encuentran los algoritmos de Wu y Kabat (1970), y Jores *et al.*, (1990). El cálculo de la variabilidad se realizó en cada posición del alineamiento múltiple previamente obtenido y usando las siguiente fórmulas:

i) Índice Wu-Kabat (V_{wk}):

$$V_{wk} = k/p_1$$

donde k es el número de diferentes amino ácidos que aparecen en una posición dada y p_1 es la frecuencia del amino ácido mas común en esa posición.

ii) Índice modificado de Wu-Kabat : Jores, (1990) (V_j):

$$V_j = j/np_1$$

donde j es el número de pares de aminoácidos distinguibles que aparecen en la posición dada y p_1 es la frecuencia del par de aminoácidos mas común que aparecen en esa posición.

Propiedades fisicoquímicas comunes en el potencial dominio HA.

Esta evaluación se realizó únicamente para el potencial dominio hemaglutinina y considera el promedio de aminoácidos en cada posición y su correlación con la clasificación de aminoácidos jerarquizados Jimenez-Montaña, (1984).

De la predicción de epítopes y su validación.

Para la identificación de epítopes se utilizaron tres programa localizados dentro del paquete Anthroth (Deleage, 1988) basados en diferentes formulaciones: Hoop-Wood (1981), Parker (1986) y Welling (1985), con un margen de ventana de 9 residuos, por tratarse de una proteína potencialmente transmembranal.

La manera como se obtuvieron las mejores definiciones fue considerando las siguientes restricciones:

- 1) Que los tres programas definieran a una región como epítope antigénico
- 2) Que su correlación estructural y de propiedades fisicoquímicas coincidiera con las propiedades ideales de un epítope antigénico, flexibilidad, accesibilidad, hidrofiliidad y, de preferencia, en una estructura de tipo asa.

Se consideró la presencia de un péptido no definido como antigénico por ninguno de los algoritmos, como un péptido de control.

Síntesis y evaluación de los Péptidos Antigénicos.

Los péptidos fueron sintetizados por la técnica Fmoc y se adquirieron comercialmente con un grado de pureza del 80%, y por medio FPLC se evaluaron los pesos estimados para ellos.

ELISA de los péptidos antigénicos.

Se realizó el procedimiento clásico de ELISA, fijando 100 y 25µg/ml de péptido B y C con Buffer de Bicarbonatos a placas de microtitulación, previo a la activación de la placa por una exposición de 20 min a una fuente de rayos ultravioleta (Boudet *et al.*, 1989). Posteriormente se utilizó suero de Cerdo infectado experimentalmente con el virus anti LPM a una dilución de 1:600, como suero positivo y suero del mismo cerdo previo a la inmunización, como suero negativo. Finalmente se empleó Suero de Conejo anti gamas totales de Cerdo acoplado a peroxidasa como segundo anticuerpo a una dilución de 1:1000. Las densidades ópticas que se expresan son el resultado de la resta de las obtenidas del control del primer y segundo anticuerpo, garantizando así que las densidades correspondieran a los valores de los anticuerpos pegados al péptido.

Ingeniería Genética.

La manipulación de DNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook, Fritch y Maniatis (Sambrook *et al.*, 1989)

Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *E. coli* DH5α (gibco BRL), *E. coli* UH302 (Dr Henning (Colet *et al.*, 1982), *S. typhi* ty2 (proporcionada por el INDRE)

Los plásmidos Empleados fueron: Pst13 (Contiene el gene de *OmpC* de *S. typhi* (Agüero *et al.*, 1987) proporcionado por el Dr. Felipe Cabello, Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College Valhalla, New York) y pUC18 (Gibco, BRL).

Síntesis de los Oligonucleótidos.

Se sintetizaron los oligonucleótidos que codificaron para uno de los péptidos de la HN de LPM, y además se le adicionó en sus extremos 3' y 5', las secuencias complementarias para el inicio y final del asa 5 del gene de la porina. Se seleccionaron aquellos codones de mayor uso para bacterias manteniendo el mismo tipo de amino ácidos en la proteína.

La secuencia del extremo 5---3 fue

A) 5' ACC ACC ACC TGC TTC CGC GAT ACC GAT ACC GGC AAA GAT CGC GCC ACG GTT TAC 3'

B) 3' TTT GCA TGA CGG CTA GTC TGG TGG TGG ACG AAG GCG CTA TGG CTA TGG CCG TTT 5'

Las secuencias subrayadas corresponden a la secuencia homóloga donde empieza y termina respectivamente el asa 5 del gene de la porina OmpC.

Se sintetizaron posteriormente los primers que corresponden al principio y final del gene que codifica para OmpC.

(73 oligo C) 5' CGG GAA GCT TAG GAG TAA TTA AAA TGG ATA TCG TCG AAA
TTT ATA ATA AAG ACC GCA ACA AA 3'

(74 oligo D) 5' CGG GGG ATC CTT AGA ATT CGA ACT GGT AAA CCA GAC CCA 3'

Primer proceso de Amplificación: Obtención de los fragmentos A-C y B-D.

Los primeros fragmentos se obtuvieron por separado y utilizando en cada caso los primers: A-C, del principio del asa 5 (A) al principio del gene de OmpC (C) (A-C), y del final del asa 5 (B) al final del gene de OmpC de *Salmonella typhi* (D) (B-D), y como templete el plásmido Pst13 el cual contiene el gene de OmpC. La amplificación se realizó en un termociclador (Robocycler Stratagene), bajo las siguientes condiciones.

Concentración de reactivos utilizados para la amplificación por PCR.

	CONCENTRACIÓN
DNA plásmido PST13-OmpC de <i>S. typhi</i> .	0.1 ng
Primers A y C	50pg
Primers B y D	50 pg
mezcla de desoxinucleótidos	0.2 mM
MgCl ₂	1.3 nM
Taq DNA polimerasa	1 U
Buffer de reacción 10X	10 µl
Agua inyectable c.b.p.	100 µl

Programa del proceso de amplificación.

Número de ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
	T (°C)	T (min)	T (°C)	T (min)	T (°C)	T(min)
1	95	5	40	1	72	1
29	95	1	40	1	72	45
1			72	4		

Los fragmentos obtenidos fueron purificado por precipitación con perlas de vidrio

Purificación de fragmentos de DNA por precipitación con perlas de Vidrio.

Se corrió un gel preparativo de agarosa al 1%, con aproximadamente 200 ng de DNA previamente obtenido, las muestras se corrieron en una cámara horizontal (Horizon 5-8, BRL), a 75 V (15V/cm³), durante 45 min utilizando como amortiguador de corriente TAE 1X, la banda correspondiente al fragmento de interés fue cortado de los geles de agarosa y depositado en tubos Eppendorf para su purificación. Posteriormente se agregaron 800 µl (3 volúmenes) de Ioduro de Sodio 6 M, y se incubó a 56°C hasta que la agarosa se disolvió, se agregaron entonces 5 µl de perlas de vidrio, se incubó en hielo durante 30 min (agitando el tubo frecuentemente), y en seguida se centrifugó 1 min a 6,000 rpm eliminando el sobrenadante, las perlas de vidrio se lavaron tres veces con "New-Wash" (NaCl 50 mM, y etanol al 50%) y se resuspendieron después en 50 ml de agua estéril, se dejaron 20 min a 56°C y se centrifugó de nuevo, el sobrenadante se separó en un tubo limpio. Las perlas se resuspendieron posteriormente en 20 µl de agua inyectable y se incubaron 20 min más a 56°C, el sobrenadante fue recuperado y se verificó la presencia de DNA corriendo 2 µl de éste en un gel de agarosa al 1%.

Segundo Proceso de amplificación Obtención del gene ompC-HNA.

Posterior a la limpieza de los fragmentos se realizó la segunda fase de amplificación utilizando como template a los dos fragmentos A-C y B-D y al plasmido pST13, las condiciones fueron las siguientes:

	CONCENTRACIÓN
pST13	0.1 ng
"productos de la primera amplificación"	0.5 ng

"primers externos, C y D"	50pg
mezcla de desoxinucleótidos	0.2 mM
MgCl ₂	1.3 mM
Taq DNA polimerasa	1 U
Buffer de reacción 10X	10 µl
Agua inyectable c. b. p.	100 µl

Número de ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	90	5	45	1.3	72	1.3
25	90	1.3	45	1.3	72	1.3
1					72	1

Cuantificación de DNA.

El DNA se cuantificó en el espectrofotómetro a 260 nm. Las muestras se diluyeron 1:100 en agua. Las concentraciones de DNA se determinaron mediante la siguiente fórmula.

Conc. de DNA = 50 µg/ml X factor de dilución X D.O a 260 nm

Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa (Ultra pure, GIBCO, BRL) al 1 %, en una cámara horizontal (Horizon 5-8, BRL), utilizando 50 ng de DNA a 75 V (15V/cm²), durante 45 min utilizando como amortiguador de corrimiento TAE 1X. La agarosa contenía 1 mg de bromuro de etidio, al terminar el corrimiento el gel se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta para ser fotografiado.

Rellenado del producto de Fusión con la enzima PfuI.

A 500 ng del producto de fusión obtenido de la PCR fue relleno con la enzima polimerasa PfuI, adicionando 1 mM de cada uno de los Nucleótidos, así como buffer, cloruro de magnesio y agua, se dejó la reacción 2hrs a Temperatura Ambiente.

Digestión de DNA.

Las digestiones se realizaron de manera estandar utilizando aproximadamente 100 ng de DNA plasmidico o proveniente de PCR, los cuales se depositaron en tubos Eppendorf, con un volumen final de 50 µl durante dos hrs, adicionando 5 U de la enzima de restricción, 5 µl de amortiguador y 45 µl de agua estéril inyectable.

Ligación del gene OmpC-HNA al vector de expresión PUC18.

En un tubo Eppendorf se mezclaron 50 ng del DNA plasmidico (pUC18), digerido con la enzima SmaI, más 100 ng del inserto (Ompc-HNA), purificados por perlas de vidrio y relleno con la enzima PfuI, a la mezcla se le agregaron 2 µl de amortiguador para enzima T₄ ligasa (GIBCO, BRL) y 1 µl de dicha enzima. Se llevó a un volumen total de 20 µl con agua estéril y se incubó a 16°C toda la noche.

Células Competentes y transformación bacteriana.

A partir de las cepas E. Coli DH5α y UH302 se cultivó una colonia en 10 ml de medio Luria toda la noche a 37° C, en agitación constante de 200 rpm, posteriormente se tomó 1 ml y se agregó a 200 ml de medio nuevo, se incubó hasta que la densidad óptica a los 600 nm fue de 0.6, se agregó 600 ml más de medio y se mantuvo bajo las mismas condiciones por 15 minutos. Posteriormente la bacteria obtenida se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, el botón bacteriano se resuspendió con 250 ml 0.1 M de CaCl₂ y se dejó reposar 2 hrs, se centrifugó y el botón se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 10% a 0°C, se tomaron alícuotas de 100 ml en tubos Eppendorf estériles. Cada alícuota se mezcló con la ligación previamente obtenida y se incubaron 30 min, posteriormente se les dio un choque térmico de 42°C durante 60 seg. Las bacterias se incubaron 5 min en hielo, y posteriormente se le añadió 1 ml de medio SOC (bacto-triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5 mM, glucosa 20 mM, pH 7.0); se incubó 30 min a 37° C, en agitación constante 200 rpm, finalmente 100 µl de la suspensión bacteriana se sembraron en cajas con medio sólido MacKonkey con Ampicilina.

Identificación de las colonias transformadas.

Las colonias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en placas de MacKonkey - Lactosa, con la finalidad de identificar las colonias positivas con coloración azulada las cuales contienen el plásmido con el gene recombinante, posteriormente se transfirieron a medio sólido de Infusión Cerebro Corazón (BHI-Agar) conteniendo 100 mg/ml de ampicilina. Las colonias

resistentes a ampicilina se transfirieron en 3 ml de medio BHI líquido y se incubaron a 37 °C, en agitación orbital 200 rpm, toda la noche. Posteriormente se cosecharon las bacterias y se lavaron con SSI. Se extrajo DNA plasmídico y se verificó su identidad por su peso y por medio sus patrones de corte con enzimas de restricción

Purificación de DNA plasmídico.

Se creció la bacteria en 5 ml de medio Luria a 37°C, en presencia de ampicilina, de esta semilla se tomaron 200 ml y se inocularon en 10 ml. Posteriormente, se centrifugó la bacteria, se lavó y resuspendió en solución salina isotónica (SSI).

Se crecieron 3 ml de las cepas bacterianas por 24 hrs a 37°C en presencia de antibiótico (dependiendo del marcador de resistencia que les confirió el plásmido 100mg/ml de ampicilina). Se centrifugaron y se lavaron con SSI. El sedimento bacteriano se resuspendió en 200 ml de TELT (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 62.5 mM, LiCl 2.5 M y Tritón X-100 al 0.4%), se calentó a 100°C durante 90 seg. Al finalizar la lisis se colocó la mezcla de reacción en hielo durante 5 min, se centrifugó 8 min a 14,000 rpm. El sobrenadante de la reacción de lisis bacteriana se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el DNA plasmídico con 100 µl de isopropanol, las muestras se centrifugaron 5 min, el precipitado se lavó con etanol al 70%, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 50 µl de agua destilada.

Hibridación de DNA y detección por Southern blot.

El DNA plasmídico se digirió dos horas con la enzima de restricción de interés. Posteriormente, se realizó el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% y 0.5mg/ml de bromuro de etidio a 25 V en una cámara Horizon (BRL) por aproximadamente 12 hrs en amortiguador de corrimiento TBE 0.5X. Después el gel se sumergió en amortiguador desnaturante (NaOH 0.5 M, NaCl 1 M) durante 30 min, se lavó con agua desionizada y se sumergió en amortiguador neutralizante (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 3 M pH= 7.4), por 30 min. El DNA se transfirió a papel de nitrocelulosa. La sonda empleada en la hibridación se preparó de acuerdo al método de "Random Primer". Aproximadamente 10 mg de DNA, se desnaturizó por ebullición durante 10 min y se transfirió a hielo por 5 min, posteriormente se adicionaron 3 µl de mezcla de nucleótidos (sin CTP), 2 µl de amortiguador para la polimerasa Klenow, 5 µl de α-CTP marcada con ³²P, 1 µl de dicha enzima y se llevó a 20 µl de reacción con agua estéril. Se incubó 2 hrs a 37°C. Después de lo anterior la sonda marcada se purificó mediante una columna de Sephadex G-50 (Sigma). La

hibridación se realizó colocando la membrana en solución de hibridación (SSPE 4X , DENHARDT al 10%, SDS al 20%), con la sonda radioactiva (previamente desnaturalizada), se incubó toda la noche a 68°C, posteriormente se lavó la membrana 8 veces durante 30 min a 68°C con amortiguador de lavado (SDS 0.1 %, SSC 0.5 X), y se expuso a una película (Kodak) durante 24 hrs.

Purificación de Proteínas de Membrana Externa por Método de Nikaido.

Para comprobar la presencia y producción de la proteína recombinada por la bacteria, se purificó porina utilizando el proceso descrito por Nikaido (1987). Las bacterias fueron cultivadas y cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico, posteriormente se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 en 660nm; se rompieron por sonicación en periodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Se eliminaron los restos bacterianos al centrifugar a 700xg/15min, la envoltura celular se obtuvo por ultracentrifugación a 45,000 xg/40 min a 20°C, esta se solubilizó en Tris 10mM, pH 7.7 y SDS al 2% y se incubó 30 min a 32°C, posteriormente se ultracentrifugó y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. Del sedimento obtenido en este segundo proceso, se extrajeron las proteínas unidas, solubilizando con Tris 50mM, pH 7.7 que contiene SDS al 2% EDTA 5mM, NaCl 0.4M y β-mercaptoetanol al 0.05% después de un periodo de incubación de 2 h a 37°C, se centrifugó a 45,000xg/30min a 25°C y el material sobrenadante se corrió en un gel de acrilamida.

Cuantificación de proteínas.

Con la finalidad de evaluar la cantidad de proteína obtenida en el paso anterior, se realizó la cuantificación de acuerdo al método descrito de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) empleando albúmina sérica bovina como estándar.

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

La electroforesis se realizó según la técnica descrita por Laemmli (1970). Los geles se corrieron en cámaras verticales (LKB Instruments), en presencia de SDS, en condiciones reductoras y un sistema de amortiguador discontinuo. El gel introductor contenía una concentración final de 5% de acrilamida, 0.13% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS en Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8. El gel separador tenía una concentración de 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS en Tris-HCl 0.35 M a pH 8.8. Las bacterias se ajustaron espectrofotométricamente a 1×10^9 /ml y la cantidad de proteína se midió por el método de Lowry. Las muestras se

resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 8.8, SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%), se hirvieron por 10 minutos y se corrieron a 30 mA por 6 h a temperatura ambiente. El amortiguador de corrimiento contenía Tris 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%.

Posteriormente, los geles se tñieron en azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol-acético-agua (45:10:45). El exceso de colorantes se eliminó empleando una solución de metanol-acético-agua (5:10:85).

Citofluorometría de flujo FACS

Con la finalidad de evaluar la expresión y correcta presentación en la superficie de la proteína quimérica y del péptido A, se realizó un proceso de marcaje utilizando para ello anticuerpos anti HN. Se cultivaron toda la noche las bacterias E. coli UH302-pUC18 HNA, E. coli UH302 y Salmonella typhi Ty2, en 50ml de medio LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina, (con excepción de UH302). Las bacterias fueron cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico. Se centrifugaron y los botones se lavaron 3 veces con PBS 1X y se centrifugan a 3500 rpm 10 min, posteriormente se ajustó la D.O. de las muestras a 0.6 en 540 nm (asegurando una concentración aprox. de cada cepa de 1×10^9 bac/ml), esta concentración inicial se diluyó en una proporción 1:10 tomando 100 μ l de bacteria y 900 μ l de PBS 1X, la solución resultante se centrifugó y el material precipitado se resuspendió en 100 μ l de suero hiperinmune de conejo, previamente inmunoadsorbido con las cepa E. coli UH302-PST13, que expresa OmpC. Se incubó a 37°C 1 h. Se lavó 2 veces con PBS SNC 2%, suero (centrifugando en cada ocasión) 10,000 rpm 8 min. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo monoclonal anti-IgG-conejo 1:1000 (Sigma Co.) marcado con Isotiocianato de fluoresceína, se incubó a 37°C, de 40min a 1hr. Esta mezcla se lavó dos veces con SSI, se centrifugó y dejó secar; se agregó posteriormente yoduro de propidio en PBS. La intensidad de la fluorescencia se determinó en un citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View C.A.), analizando 10^3 bacterias en cada una de las muestras.

Inmunización utilizando E. coli UH302-PUC18-HNA, acarreadora del péptido heterólogo.

Se inmunizaron 4 grupos de 5 ratones Balb-c de 20 días de edad, con 100 μ l de bacteria proveniente de un cultivo con un crecimiento en fase logarítmica, resuspendiéndose en PBS y llevada a una concentración aproximada de 1×10^8 bacterias con una D.O. de 0.5-0.6 a 540nm.

El esquema de inmunización fue como sigue:

Grupo 1 y 2 Inmunización via oral, previamente se aplicaron 100µl de Bicarbonato de sodio por la misma vía, para neutralizar un poco pH estomacal y evitar en lo posible muerte bacteriana.

- 5 ratones se inmunizaron con la E. coli UH302, conteniendo el plásmido pUC18.

- 5 ratones se inmunizaron con la E. coli UH302, conteniendo el plásmido pUC18-HNA.

Grupo 3 y 4: Inmunización via intraperitoneal, previo a esta inmunización se fijo la bacteria con formaldehído.

- 5 ratones se inmunizaron con E. coli UH302, conteniendo el plásmido pUC18.

- 5 ratones se inmunizaron con E. coli UH302, conteniendo el plásmido pUC18-HNA.

El calendario de inmunización y sangrado fue como sigue:

Día 0 (primer sangrado) Inmunización; Día 10 (segundo Sangrado) 1er refuerzo de inmunización (100 µl de bacteria a la misma concentración de acuerdo al grupo); Día 20 (tercer sangrado), Día 30 sangrado a blanco. La sangre obtenida se centrifugó y el suero sobrenadante se almacenó a -70°C, hasta su utilización.

Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Se realizó de acuerdo al método de Engvall (Engvall., 1971). Se recubrieron placas para microtitulación con 50 µg/ml de virus LPM, en buffer de carbonatos pH 9.5. y se incubó por 2 hrs a 37 °C. Posteriormente se dejaron toda la noche a 4 °C. Para bloquear se adicionaron 100 µl/pozo de una solución de PBS-Leche al 5%, por 1 h. Se le adicionó como primer anticuerpo el suero de ratones inmunizados con UH302-Puc18-HNA de ratón diluido 1:50 en PBS-leche 5%. Se incubó la placa a 37 °C por 2 hrs, y se adicionó el segundo anticuerpo de conejo anti-gamaglobulinas totales de ratón, diluido 1:1000, se incubó 2 hrs. Se adicionó como substrato O-fenilendiamina de un stock de 6mg/12ml. Para preparar la mezcla se empleó buffer de citratos de pH 5.6. Se paró la reacción a los 10 minutos de incubación adicionando 50 µl por pozo de HCl 3N. Se midió la absorbancia a 492 nm. Entre cada paso se realizaron 4 lavados con una mezcla de PBS-Tween 20 al 0.1%.

Inhibición de la actividad hemaglutinante del virus.

Con la finalidad de evaluar la potencial función inmunológica de los sueros obtenidos al inmunizar con la bacteria acarreadora de la proteína OmpC-HNA, el suero de la inmunización anterior se utilizó para inhibir la actividad hemaglutinante, propiedad

partícula de la proteína HN de LPM, descrita en generalidades. Se agregaron a una placa de hemaglutinación 10 µl de solución salina NaCl al 10%, al primer pozo 50 µl de suero provenientes del sangrado a blanco con una concentración de proteínas totales de 3.2 mg/ml y se realizó una dilución seriada, posteriormente se agregaron 8 unidades hemaglutinantes de virus LPM por pozo de virus y se incubaron 30 min, a 30°C. Posteriormente se agregaron 50µl de eritrocitos de bovino al 1% el título de aglutinación se determinó después de 30 min de incubación.

IV RESULTADOS.

Caracterización Estructural.

En la tabla 1 se observa el porcentaje de las estructuras secundarias determinadas con los diferentes algoritmos empleados así como nuestra predicción. Nuestra predicción, (estructura consenso) muestra un bajo porcentaje de estructuras alfa hélice (11.7%), seguido de un alto porcentaje de hebras beta (43.3%) y estructuras asa (45%) (Tabla 1). La estructura consenso obtenida evidenció una organización de tipo beta-asa-beta, interrumpido en algunas ocasiones por unos segmentos de Alfa hélice en la mitad y al final de la secuencia (Figura 1).

Tabla 1: Comparación del contenido de estructura secundaria (%) determinado con los diferentes métodos de predicción en la HN de LPM.

Método	Alfa Hélice	Hebra Beta	Asa
<i>Chou-Fasman.</i>	19.9	55.2	24.8
<i>Levin</i>	23.0	26.0	28.9
<i>Garnier (1986)</i>	16.3	23.9	59.6
<i>Deleage - Roux</i>	6.2	45.8	47.9
<i>Rost</i>	19.6	21.4	59.0
<i>TOPITS</i>	18.0	25.9	56.1
*Consenso	11.7	43.3	45.0

*Valores obtenidos de la figura 2.

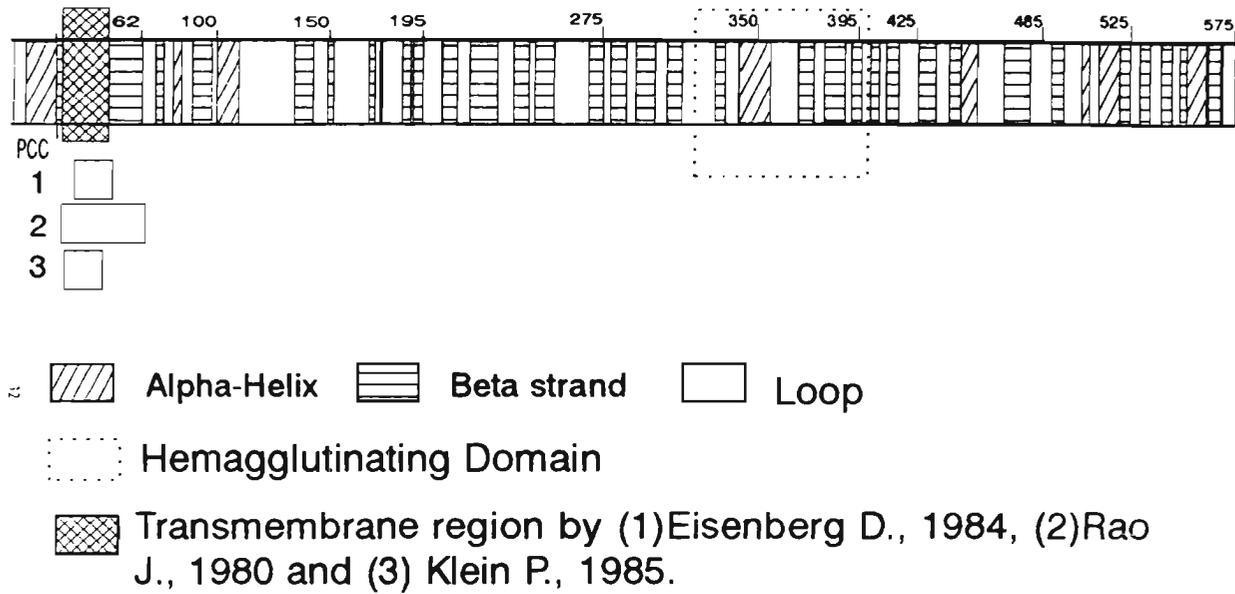


Figura 1: Representación de la estructura secundaria en la HN del rubulavirus LPM, ver figura 2 para detalles.

TOPITS

La predicción realizada con el programa TOPITS evidencio una gran similitud a la predicción con los algoritmos de Sanders y Garnier (Tabla 1), pero al compararse con nuestra predicción se observaron diferencias significativas, las mayores diferencias entre la predicción TOPITS y la nuestra se pueden localizar en la región transmembranal y las regiones de los residuos 79 al 100 y del 375 al 420 (Fig. 2). Estos datos nos permiten confirmar que la utilización de varios algoritmos de predicción y a partir de ellos generar una predicción consenso, así mismo permiten incrementar y reforzar la exactitud, precisión y coherencia de la predicción.

Caracterización Físicoquímica y definición de regiones transmembranales.

Las Propiedades de Hidropatía y accesibilidad al solvente coinciden con la estructura secundaria en su tendencia de alternancia, sin embargo la flexibilidad, no mostró esta tendencia. Los tres métodos usados para la identificación de regiones transmembranales, proponen la existencia de varias regiones con potencialidad de serlo, sin embargo, solo una región cercana al amino terminal (de los residuos 25 a 47) fue definida por todos los métodos utilizados y posee además una alta rigidez, hidrofobicidad e inaccesibilidad al solvente (Figura 1).

Análisis de Patrones y firmas

La proteína HN de LPM mostró 7 residuos potenciales de fosforilación por la proteína cinasa C; 8 con caseína cinasa C, 12 sitios con N-miristoilación y cuatro sitios de N glicosilación, los cuales coinciden con los determinados en la secuencia de DNA de la HN por Sundqvist *et al.*, (1992).

Alineamiento

El alineamiento de las 25 secuencias de proteínas HN de diversos paramixovirus evidenció la presencia de algunos patrones reportados por Morrison y Portner (1991), tales como NRKSCSI/V/L y GA/SEGRI/V/L (Figura 3-2 y 4 respectivamente) además del patrón FXXYGGL/V/M pobremente caracterizado (Figura 3-3). Es interesante mencionar que los patrones GA/SEGRI/V/L y FXXYGGL/V/M, marcan respectivamente el principio y el fin de una región que comprende cerca de 100 residuos y que en previos estudios estructurales ha sido completamente omitida. Mutaciones dentro del patrón GA/SEGRI/V/L, dan lugar a una alteración en la actividad hemaglutinante, por lo que muy posiblemente esta región pueda contener al dominio hemaglutinina, sin embargo no se encuentran reportes donde se realicen mutaciones en algún residuo dentro del potencial dominio y se evalúen las repercusiones en la actividad hemaglutinante.

Asimismo se observan 3 nuevos patrones sin reporte previo en la literatura, uno de ellos es el patrón intracelular altamente conservado TXR (Figura 3-1), cuya Treonina es

potencialmente fosforilable por proteína cinasa C y es altamente conservada en todas las secuencias excepto en el virus Sendai, donde se observa el mismo residuo solo que en la posición 19. Otro patrón identificado en todas las secuencias se localizó entre los residuos 16 a 25 (Figura 3-1), la peculiaridad de este consiste, además de localizarse intracelularmente, en su particularidad por la especie del virus. Es decir mientras que para el virus Parainfluenza el patrón esta caracterizado por la secuencia SIPKRTCRII, en el virus de la enfermedad de Newcastle se observa el patrón REAKNTWRLV, manteniéndose constante solo el patrón TXR. El último patrón determinado corresponde a una secuencia sumamente largo de los residuos 464 al 475, CPXXCI/V/LS/T/KGVYXD, (Figura 3-5) el cual carece de algún reporte previo y sin una función o actividad biológica asignada.

Figura 3: Alineamiento múltiple de varias secuencias de amino ácidos de HN de paramyxovirus. La enumeración en itálicas corresponde a la empleada en la figura 2 y la enumeración inferior a la del alineamiento. * en la parte superior indica el inicio del patrón TXR. Números entre paréntesis en la parte inferior indican los patrones altamente conservados: (1) El patrón especie-específico, (2) El patrón con participación en la actividad Neuraminidasa NRKSCS, (3) y (4) Los patrones de inicio y final del posible dominio Hemaglutinina, FXXGGV/L/M, GA/SEGR/V/L y (5) Nuevo patrón con función desconocida CPXXCI/V/LS/T/KGVYXD.

Análisis de Variabilidad

En la figura 4 observamos que el perfil de variabilidad obtenido con el índice de Wu-Kabat, (1970), se encuentra muy disperso y no permite una clara identificación de regiones conservadas o variables, aunque se puede inferir la existencia de 3 regiones. La primera presentó los valores más altos en todo el perfil, y se localizó inmediatamente después de la zona transmembranal de los residuos 80 al 110 (1), la siguiente comprendió del residuo 125 al 160 (2) y la última adyacente al potencial dominio hemaglutinina entre los residuos 300 al 340 (3), es importante mencionar que cerca de esta última región se ha identificado experimentalmente un péptido antigénico para el virus Newcastle (lorio *et al.*, 1992), por lo que la participación de esta región en localizar la diversidad antigénica no es descartable.

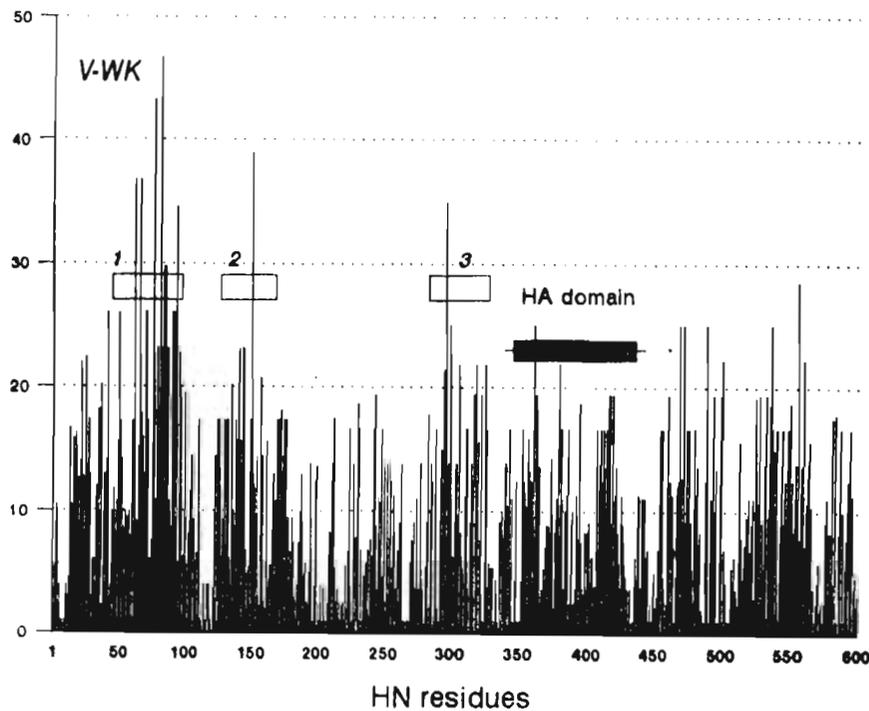


Figura 4: Gráfico de variabilidad para las secuencias HN usando el índice de VK, las regiones variables están numeradas 1,2, 3 y el potencial dominio Hemaglutinina se encuentra delimitado por un recuadro negro.

La figura 5 muestra el perfil de variabilidad obtenido con el índice de Jores (1990), mediante este algoritmo se definieron con mayor claridad las regiones 1,2 y 3 además de dos nuevas zonas después del potencial dominio hemaglutinina, del 470 al 510 (4) y del 540 al 550 (5) por lo que este índice permitió una mejor definición de regiones variables, a diferencia del perfil de obtenido con el índice de Wu-Kabat, es de hacer mención que esta es la primera ocasión que se realiza un análisis de variabilidad en secuencias HN, por lo que su análisis experimental así como las implicaciones biológicas y de las regiones variables permitirán evaluar el valor de estos índices

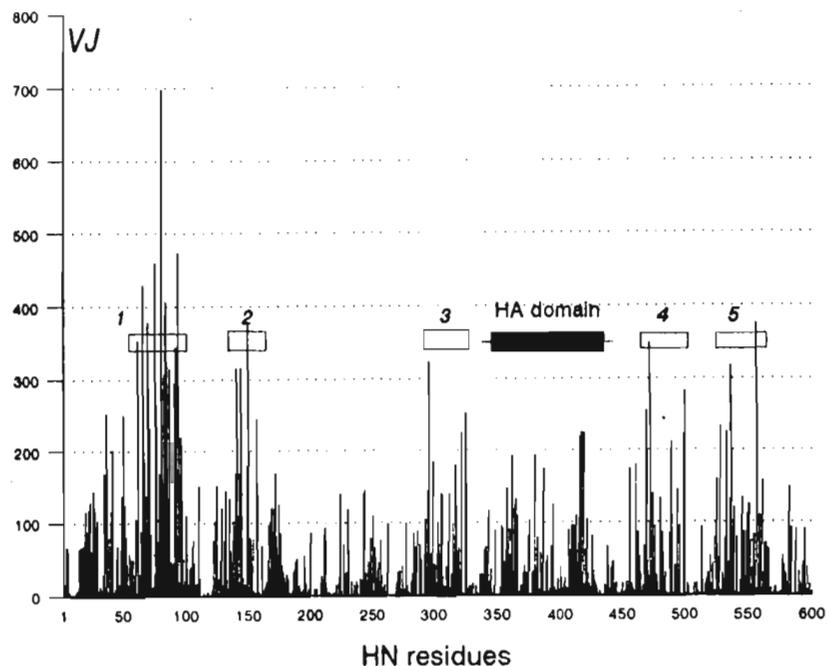


Figura 5: Gráfico de variabilidad para las secuencias HN usando el índice VJ, las regiones variables están enumeradas, 1, 2, 3, 4, y 5, y el potencial dominio Hemaglutinina se encuentra delimitado por un recuadro negro

Variabilidad del Potencial Dominio Hemaglutinina

El análisis de variabilidad del potencial dominio Hemaglutinina con ambos índices nuevamente comprobó la efectividad del índice de Jores, debido a que el índice de Wu-Kabat (Figura 6a) no mostró claramente ciertas regiones como variables, mientras que el índice de Jores (Figura 6b), permitió identificar dos agrupamientos claros de variabilidad, uno comprendiendo los residuos 358 al 369 (región 6) y otro de los residuos 409 al 424 (región 7) (figura 6b), además de algunos residuos dispersos con valores altos.

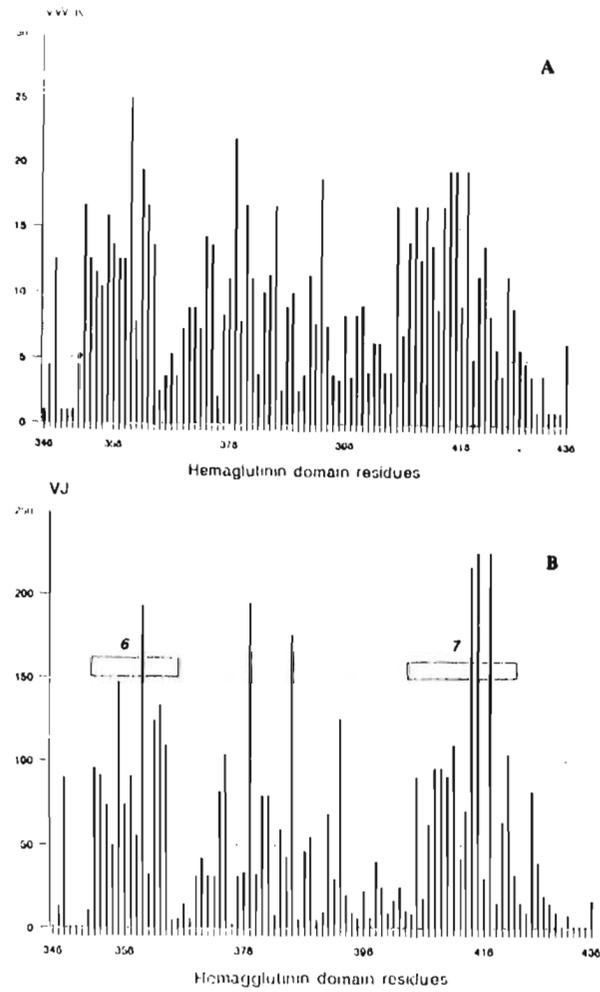


Figura 6. Gráfico de variabilidad para el potencial dominio hemaglutinina, usando los algoritmos VK- W(a) y VJ (b), las únicas regiones variables definidas son 6 y 7

Propiedades fisicoquímicas comunes en cada posición del potencial dominio Hemaglutinina.

De las 90 posiciones consideradas en el análisis dentro del potencial dominio hemaglutinina 13 no mostraron alguna propiedad fisicoquímica común pero si una variabilidad alta, estas fueron las posiciones 353, 361, 363, 374, 379, 386, 388, 412, 413, 416, 419, 422, y 426

Cinco posiciones poseen altos valores de variabilidad y una propiedad fisicoquímica común 357, 364, 375 y 394, de las cuales el 76%, 64%, 76% y 76% de los amino ácidos son hidrofílicos, y la posición 417, con un 96% de los residuos con algún tipo de carga (Figura 6B.7). También se observaron 7 posiciones altamente conservadas pero sin una propiedad fisicoquímica claramente definible tales como la 360, con un 36% de amino ácidos hidrofóbicos y 40% con carga, la posición 392, con un 52% de amino ácidos hidrofóbicos, la posición 409 conteniendo un 44% de amino ácidos hidrofílicos y un 40% con carga, la posición 420 contiene un 44% de amino ácidos Cisteínas y un 36 % Prolinas, la posición 423 conteniendo un 44% de amino ácidos hidrofóbicos, la 425 con un 52% de amino ácidos hidrofóbicos y la 428 con 52% de amino ácidos hidrofílicos. Las implicaciones biológicas derivadas de este análisis serán discutidas más adelante.

Localización y caracterización de epítopes antigénicos en la HN de LPM.

La tabla 2 muestra las regiones predichas como antigénicas en la secuencia HN de LPM con los tres algoritmos utilizados, el algoritmo Hoop-Wodd, definió solamente 3 regiones, mientras que los algoritmos de Parker y de Welling mostraron 7 y 9 regiones respectivamente con diversas características estructurales y fisicoquímicas. De las aproximadamente 15 regiones obtenidas anteriormente solo se consideraron para trabajar aquellas que fueran definidas por los tres algoritmos, mostraran una carácter hidrofílico, buena exposición al solvente y de preferencia con una estructura secundaria de tipo asa. Las regiones que cumplieron con las restricciones anteriores fueron: 1) De los residuos 251-267, péptido de 18 amino ácidos de longitud YVATRSETDYAGNSPPQ, (el cual fue designado péptido HNB), y 2) péptido de la región 533-544 con 12 residuos TTTCFRDITDTGK (designado como péptido HNA) ambos con una estructura tipo Beta-Asa, con buena flexibilidad, accesibilidad e hidrofiliidad. Se consideró además la presencia de un péptido no predicho como antigénico (péptido control negativo), comprende 10 residuos de longitud del 315 al 325, y con la secuencia PAYGGMQQILA, designado como péptido HNC. Localizado al inicio del dominio HA, formando parte de los motivos más conservados entre las diferentes secuencias (Fig. 3.3).

Tabla 2: Localización y propiedades de las epitopes predichas para la HN de LPM, con los diferentes algoritmos

Algoritmo	Región	Estructura	Flexibilidad	Accesibilidad	Hidropatia
Hoop-Wood	254-249	Beta-Asa	+	Expuesto	Filico
	498-503	Asa	+	Expuesto	Filico
	538-544	Asa	+	Intermedio	Filico
Parker	109-119	Asa	1/2	Expuesto	1/2
	251-266	Beta-Asa	+	Expuesto	Filico
	351-360	Alfa-Asa	1/2	1/2	Filico
	450-461	Alfa-Asa	1/2	1/2	Filico
	477-486	Asa	1/2	1/2	1/2
	518-530	Alfa-Beta-Asa	-	1/2	1/2
	533-540	Beta-Asa	1/2	Expuesto	Filico
	536-541	Beta-Asa	+	Expuesto	Filico
Welling	72-77	Asa-Alfa	1/2	1/2	Filico
	112-119	Asa	+	Expuesto	Filico
	124-131	Asa	+	1/2	Filico
	195-198	Asa	1/2	1/2	1/2
	212-217	Asa-Beta	1/2	1/2	Filico
	252-260	Beta-Asa	+	Expuesto	Filico
	488-501	Beta-Asa	1/2	1/2	1/2
	516-532	Beta-Asa	1/2	1/2	Filico
	536-541	Beta-Asa	+	Expuesto	Filico

En negrillas están indicados aquellos seleccionados como los más antigenicos.

ELISA de los Péptidos Sintéticos.

El PAGE de los péptidos permitió observar su peso correcto (figura no mostrada). El ELISA clasico de los péptidos sintéticos B y C, utilizando sueros de cerdo infectado y no infectado con el virus LPM, ambos ajustados a la misma concentración de proteína fueron utilizados a una dilución de 1:600. Las Densidad Ópticas (D.O.) observadas para el péptido B a las concentraciones de 100 y 25 µg/ml con el suero preinmune fueron de 0.06 y 0.08 (Figura 7 Columnas 3 y 4) mientras que al compararse con las D.O. obtenidas de suero postinmune estas se incrementaron a 0.11 y 0.14 (Columna 1 y 2) es decir se observó un

incremento de cerca del 100% en las densidades ópticas, lo que habla de un buen reconocimiento para este péptido en el virus completo. Las densidades ópticas obtenidas para el péptido C a las concentraciones de 100 y 25 $\mu\text{g/ml}$ con el suero post-inmune fueron de 0.08 y 0.09, (Columna 5 y 6), mientras que con el suero pre-inmune las D.O. descendieron a 0.06 y 0.05, un 25 y 45% respectivamente (Columna 7 y 8). Es de resaltar la obvia diferencia entre las D.O. de las columnas 1 y 2 con el resto de las densidades, lo que permite concluir el claro reconocimiento para el péptido HNB, lo mismo ocurre cuando se comparan los valores de las D.O. de las columnas 3, 4, 7 y 8 con las columnas 5 y 6, donde se puede evidenciar mayores o iguales valores en las densidades, lo que hace pensar en un bajo pero posible reconocimiento para el péptido HNC, aunque análisis más detallados nos permitirán concluir esta propuesta.

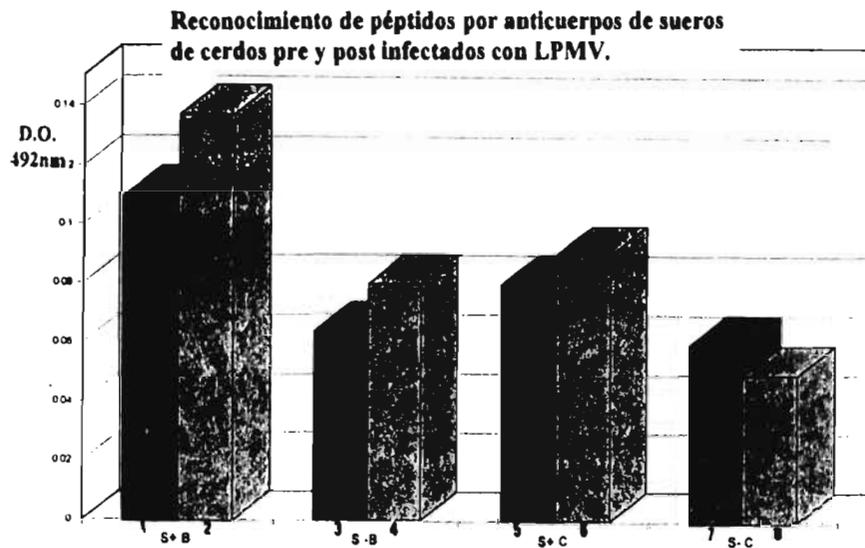


Figura 7: Reconocimiento de los péptidos predichos por medio de la técnica de ELISA utilizando suero de cerdos infectados con el virus LPM, columnas 1 y 2 100 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de péptido HNB con suero postinmune de cerdo, columnas 3 y 4 mismas concentraciones del péptido pero con suero preinmune, y el péptido HNC columnas 5 y 6, 100 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de péptido con suero postinmune, 7 y 8 preinmune, la concentración del primer anticuerpo se estandarizó a 2.5mg/ml y el segundo anticuerpo de conejo anti gamas de cerdo se acopló a peroxidasa

Construcción del gene para la proteína recombinante OmpC de *S. typhi* -HNA por PCR

El primer proceso de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa permitió la obtención de dos productos, uno con un peso de 450 pb y que comprende del final del gene de porina hasta el final del asa 5 y otro de 750 del principio del asa 5 hasta el principio del gene de la porina (Figura 8). Cada segmento contiene la secuencia que codifica para el péptido HNA, al realizar el segundo proceso de amplificación empleó como iniciadores a los productos anteriores y como templete el gene de la porina OmpC de *s. typhi* contenido en el vector de expresión Pst13, el producto resultante es un gene de 1.2 kb que corresponde al peso de la porina (Figura 8) y que al digerirse con la enzima de restricción PvuI, no se observó ningún producto de digestión por el contrario en la digestión del gene silvestre se presentaron dos productos de digestión de cerca de 400 y 800 pares de bases, lo cual confirma que el gene de fusión contiene el gene que codifica para el péptido HNA.

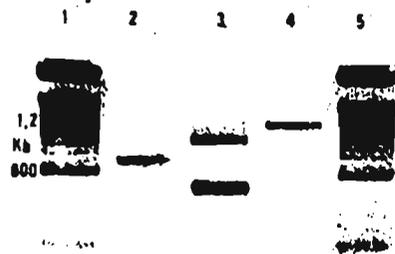


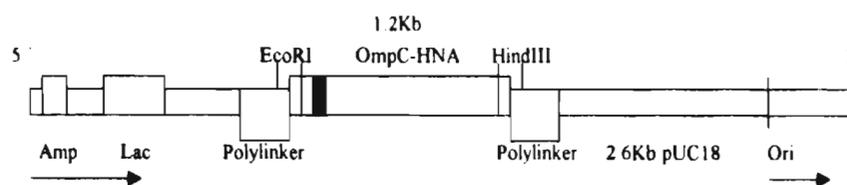
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos A-C y B-D, y del producto de Fusión, obtenido por PCR. Carril 1 pesos moleculares de 1Kb, 2) Producto A-C, 3) producto B-D, carril 4) Producto de Fusión, OmpC-HNA.

Ligación del producto de PCR al plásmido pUC18 y transformación celular.

Posterior a la síntesis del gene OmpC-HNA, los extremos 5' y 3' se rellenaron con la enzima PfuI y se defosforilaron los extremos 5' y 3' con la enzima T4 defosforilasa de manera que los únicos grupos fosfato reactivos provinieran del plásmido, en tanto que el vector de expresión Puc18, con un gene de resistencia a ampicilina y un promotor inducible por lactosa, se cortó dentro de un Polylinker con la enzima SmaI, la cual genera también extremos romos, la ligación se realizó con la enzima T4 ligasa, posteriormente el vector se transfirió a una bacteria deficiente en la producción de OmpC, E. coli UH302, garantizando así la pureza de la expresión de la proteína quimérica conteniendo al péptido HNA.

Transformación celular, presencia y orientación del gene.

La transformación celular permitió la obtención de colonias que expresan a la proteína recombinante porina-HNA, y la selección de las bacterias que contenían el gene se realizó en 4 niveles, 1) Al formar colonias con una coloración azul, en un medio rico en lactosa (Mackconkey), causada por la desactivación del promotor de lactosa, 2) Al crecer en medio conteniendo ampicilina, cerca de 75-100 colonias mostraron esta propiedad, 3) 20 de estas colonias se seleccionaron y se purificó el DNA plasmidico con la finalidad de determinar se presento un incremento en el tamaño del plásmido de 2.6 a 3.8 kb, causado por la adición del gene de OmpC, de las colonias analizadas solamente 8 mostraron un incremento en el peso del plásmido y 4) Por medio de la utilización de las enzimas de restricción EcoRI y HindIII se observó la orientación positiva del fragmento. (Esquema A)



PUC18-OmpC-HNA 3.8Kb

Esquema A. Ubicación del gene ompC-HNA dentro del plásmido pUC18 en orientación positiva, los sitios de restricción EcoRI y HindIII permiten obtener de nuevo el fragmento OmpC, los genes Amp y Lac codifican para el gene de resistencia a ampicilina y lactosa, el gene OmpC se localiza dentro de un polylinker, el peso del plásmido final es de 3.8 Kb

Producción y Purificación de OmpC-HNA en la bacteria UH302 (PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida).

EL análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida empleando porina purificada por el método de Nikaido y extracto crudo de bacteria (Figura 9), permitió observar por una parte la presencia aunque en poca cantidad la presencia de proteínas de membrana externa así como de porina recombinante Ompc-HNA de casi 253 $\mu\text{g/ml}$ (carril 5), y con una mayor concentración en el extracto crudo de casi 1500 $\mu\text{g/ml}$ (Carril 9), lo cual muestra que existe una replicación y traducción del gene, y en consecuencia producción de la proteína.

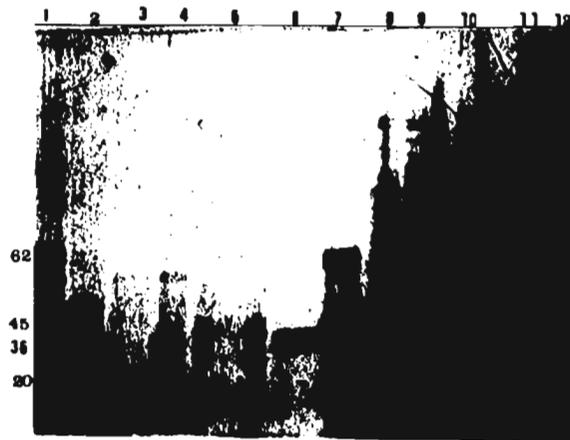


Figura 9: La electroforesis en gel de poliacrilamida de porinas purificadas y extractos crudos bacterianos se realizó en condiciones reductoras y bajo un sistema de amortiguadores discontinuos, para la porina purificada se emplearon 30 $\mu\text{g/ml}$ excepto para la construcción OmpCHN donde se agregaron 10 $\mu\text{g/ml}$, para los extractos crudos se resuspendieron $1 \times 10^9/\text{ml}$ de bacterias en amortiguador de muestra y se hirvieron por 10 minutos. Carriles 1 y 7) pesos moleculares en KDa, 2) OmpC de UH302-Pst13; 3) UH302 (control negativo); 4) OmpC de *Salmonella typhi*; 5) OmpC-HNA-UH302, 6) OmpC, 8) Extracto crudo de *S. typhi*; 9), extracto crudo de UH302-OmpCHNA; 10) UH302; 11)UH302-PST13; y 12) OmpC.

Citofluorometría de Flujo (FACS).

El análisis de citofluorometría utilizando anticuerpos de conejo anti HN (figura 10) permitió evidenciar que mientras la cepa *S. typhi* Ty2 cepa que expresa OmpC silvestre en su superficie, mostró una media de fluorescencia de 50, para la cepa UH302 deletada de la proteína OmpC se incremento a 65, y para la cepa acarreadora del péptido HNA UH302-PUC18-HNA, esta se elevó hasta 165, un incremento de 3 y 2 veces al compararse con las dos cepas utilizadas. Con lo anterior se podría mencionar que el proceso de inserción del gene que codifica para el péptido A de la HN de LPM, en el asa 5 de la OmpC, no afecta la transcripción, traducción, correcto plegado y expresión en la superficie de la bacteria, tanto de la proteína OmpC como del péptido HNA.

Reconocimiento por fluorescencia del péptido HN-A expresado en *E. coli*, por suero hiperinmune de conejo anti HN.

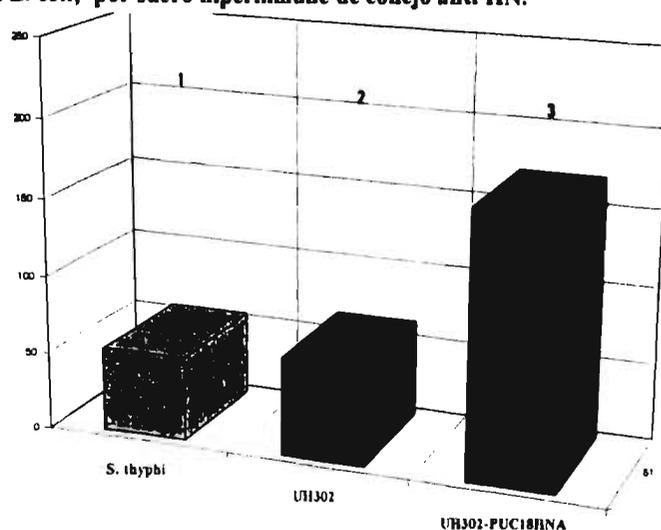


Figura 10: La presencia de la construcción OmpC-HNA en la superficie de bacteria acarreadora se evaluó por inmunofluorescencia empleando suero hiperinmune de conejo anti HN y como segundo anticuerpo se empleó un monoclonal anti IgG de conejo, acoplado a isotiocianato de fluoresceína. Se analizaron 10^3 bacterias en un citómetro de flujo FACScan. La gráfica se expresa, las medias de las fluorescencias observadas: Carril 1) *Salmonella typhi*, Ty2, 2) *E. coli* UH302, y 3) *E. coli* acarreadora de proteína de fusión UH302-pUC18-HNA.

Identificación del virus LPM por la técnica de ELISA por anticuerpos de ratones inmunizados con la bacteria acarreadora E. coli OmpC-HNA.

La gráfica 11 muestra las D.O. de los sueros provenientes de 10 ratones inmunizados por vía oral (5) e intraperitoneal (5), con la bacteria UH302-Puc18-HNA, y el reconocimiento de 50µg/ml de virus del virus LPM por pozo, las columnas 1 y 2 corresponden a los valores previos a la inmunización de .1 y .08 para los grupos oral e intraperitoneal, las columnas 3, 5 y 7 muestran los valores de la inmunización por vía oral de 0.22 y 0.19 al día 10 después de la primer inmunización, 20 después de la segunda inmunización y 30 sangrado a blanco, respectivamente, al comparar estos valores con los de la columna 1 se puede observar un incremento de casi un 110%, entre los valores pre y postinmune, sin embargo cuando se comparan entre sí los valores postinmunes en función del tiempo (columnas 3, 5 y 7), se puede observar una declinación de la D.O. causada por una posible pérdida del reconocimiento por el virus. Al compararse los valores de D.O. de los sueros del grupo de ratones inmunizados por vía intraperitoneal, suero pre inmunes columna 2, (.08) con los postinmunes columnas 4, 6 y 8, de los días 10, 20 y 30 (0.18, 0.21 y 0.34 respectivamente), se puede observar un incremento del 100, 150 y hasta un 300%, en el valor de las D.O. y en consecuencia del virus LPM. Al compararse entre sí los valores de las columnas postinmune se puede observar un incremento constante en función del tiempo al iniciar con 0.18 y concluir con 0.34.

Es interesante la comparación entre los grupos inmunizados por vía oral e intraperitoneal en función del tiempo ya que mientras en la inmunización por vía oral se observa una disminución y en la intraperitoneal se observa un comportamiento inverso, es decir un incremento de los valores de la D.O. Sin embargo se necesitarán más estudios para comprobar la eficiencia de la vía óptima para una mejor respuesta y como se demuestra con el experimento de inhibición de hemaglutinación, el tipo de anticuerpos resultante en cada vía.

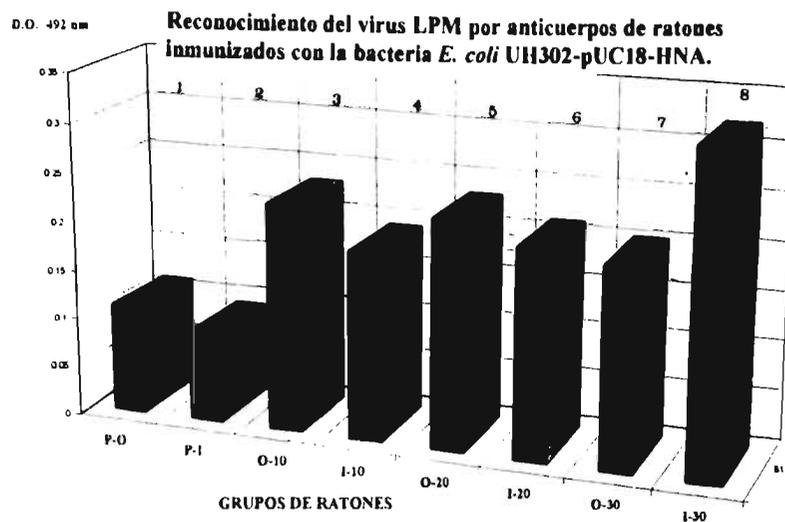


Figura 11: Determinación de anticuerpos anti LPM por la técnica de ELISA de 10 ratones inmunizados con la bacteria *E. coli* UH302-pUC18 HNA por vía oral e intraperitoneal, columnas 1 y 2 valores previos a la inmunización 3, 5 y 7, sueros de inmunización oral al día 10, 20 y 30 respectivamente. Columnas 4, 6 y 8, sueros de inmunización por vía intraperitoneal, al día 10, 20 y 30 respectivamente

Inhibición de la hemaglutinación.

La columna A de la Figura 12 muestra la inhibición obtenida con los sueros de ratones previo 10 y posterior a la inmunización (B 1:65) con el virus LPM, utilizando eritrocitos de bovino al 1% 1:65. Columnas C y D corresponden al valor de inhibición causado por el suero al día 30 de ratones inmunizados con la bacteria *E. coli* UH302-puc18, tanto por vía oral C. 1:8 como intraperitoneal D. 1:4, mientras que la inhibición de hemaglutinación con suero de ratones inmunizados con la bacteria *E. coli* UH302 acarreadora de la proteína recombinante OmpC-HNA, se incrementa a 1:132 (E) con los animales inmunizados por vía

oral y de 1:32 (F), por vía intraperitoneal. Al compararse todos los valores se puede observar un mayor incremento de la inhibición de la aglutinación al utilizar suero de ratones inmunizados con la proteína de fusión OmpC-HNA por vía intraperitoneal y principalmente por la vía oral, lo que permite determinar que los anticuerpos obtenidos con la proteína recombinante tienen potencial biológico y posible bloqueo de la infección.

Inhibición de la hemaglutinación utilizando anticuerpos de ratones inmunizados con E. coli UH302-pUC18-HNA.

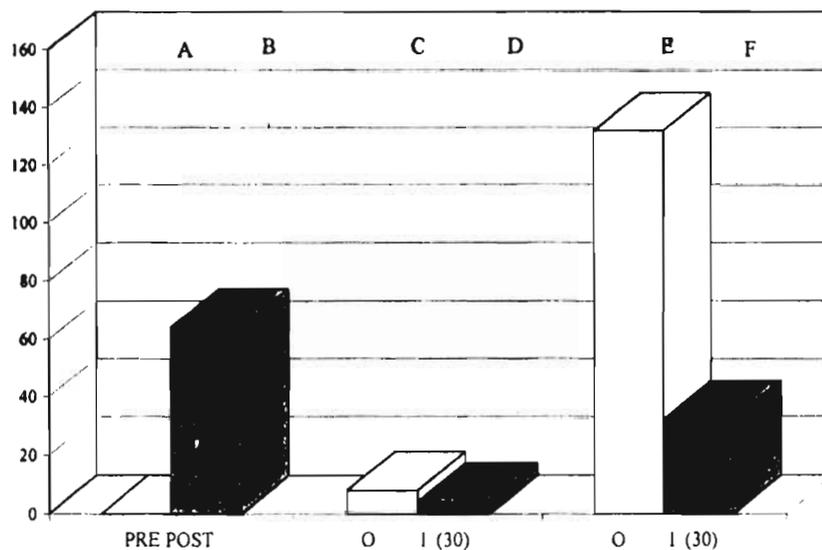


Figura 12: Inhibición de la hemaglutinación, columna A valores de inhibición de suero preinmune y B postinmune del ratones inmunicados con LPM, C y D suero proveniente de ratones inmunizados con la bacteria UH302-Puc18 como un control negativo. Columnas E y F suero proveniente de ratones inmunizados con la bacteria UH302 acarreadora de la proteína recombinante OmpC-HNA, por vía oral e intraperitoneal respectivamente.

V DISCUSIÓN

Nuestro análisis de predicción estructural permitió identificar que la HN de LPM, posee un dominio intracelular y transmembranal en la región amino y el dominio extracelular con las funciones de Hemaglutinación y Neuraminidasa en la región carboxilo y posee una organización estructural de tipo hebra beta-asa-hebra beta alternado, e interrumpido ocasionalmente por pocas alfa-helices, propuesta similar a la reportada por Colman (1993), quien comparó las secuencias HN de diversos paramixovirus (no incluida la HN de LPM) con la Neuraminidasa de Influenza y sus resultados sugieren que muy posiblemente las HNs muy posiblemente se encuentran organizadas en un plegamiento estructural de tipo hebras beta alternados por asas, pero con la limitante de no estudiar los detalles finos de la estructura secundaria, e ignorar por completo la presencia, participación e interferencia del potencial dominio Hemaglutinina. A diferencia, en este trabajo se delimita por primera vez la localización y se describe la organización estructural del potencial dominio Hemaglutinina en la HN de LPM, la cual contiene a una de las pocas estructuras alfa hélices definidas en toda la secuencia; y proponemos que la presencia de esta estructura hélice podría poseer alguna actividad en el reconocimiento por el carbohidrato receptor de la célula blanco. Trabajos previos han demostrado la existencia de estructuras de tipo alfa hélice dentro del sitio de interacción al carbohidrato, sin embargo solo la determinación de la estructura de la proteína HN por cristalografía de rayos X permitirá comprobar esta propuesta y confirmar la predicción estructural planteada en este trabajo.

Al comparar el porcentaje de las estructuras secundarias obtenidas por nuestra predicción consenso para la HN de LPM (Tabla 1) con los reportados experimentalmente para la HN del virus Sendai, obtenidos por Dicroísmo Circular (Tabla 3), se pueden observar en términos generales una gran correlación en ambas propuestas, la importancia de esta comparación radica en la similitud existente en ambos virus tanto a nivel de secuencia de aminoácidos de HN's de casi 30%, así como de las propiedades biológicas de Hemaglutinación y Neuraminidasa, lo cual nos permite proponer 2 líneas de pensamiento. La certidumbre de nuestra predicción teórica y la similitud en la estructura general entre dos proteínas de diferentes géneros de virus dentro de la familia de los paramyxovirus

Tabla 2: Estimación de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular en la HN del virus Sendai.

Método de interpretación	alfa-hélice	hebra -beta	asa (giro + aleatorio)
Chang <i>et al</i>	7.6	40.4	51.9
Bolotina <i>et al</i>	16.3	15.9	67.7
Yang y Kubota	1.0	45.0	54.0

Tomado de Baiocchi *et al.*, (1993).

Cuando se compararon los resultados en detalle de las predicciones consenso y la realizada con el algoritmo TOPITS para la HN de LPM, las mayores diferencias se localizaron en la región transmembranal del amino ácido 26 al 47, ya que la predicción consenso la definió como una estructura de tipo hebra-beta, mientras que los algoritmos de predicción de regiones transmembranales y TOPITS la definen como una alfa-hélice. Evidencia experimental proveerá más datos para la correcta definición de esta alfa-hélice o hebra-beta, transmembranal, información que ayudaría a entender la posible asociación o asociaciones con otras HN de LPM para la posible formación del tetrámero funcional o algún otro elemento de la membrana de la célula infectada.

La localización en el dominio intracelular de la HN de LPM, de un patrón de fosforilación TXR por proteína cinasa C en la Treonina 21, y su conservación en todos los miembros del género rubulavirus en el alineamiento múltiple de varias HN's, permite especular sobre la potencial importancia de este patrón biológico tanto para la HN de LPM en particular como para las HN's en general. Es de hacer notar que en vecindad a este patrón de fosforilación se observó en el alineamiento múltiple, tanto para la HN de LPM como para todas las HN de los diferentes rubulavirus un patrón de secuencias particular de la especie del virus, esta nueva firma intracelular especie-específica, que en la HN de LPM mostró según nuestra predicción una estructura de tipo alfa-hélice, podría estar implicada en la asociación con la proteína cinasa o con alguna otra proteína de activación de la célula infectada o con la misma proteína de Fusión del virus. La relevancia de la proteína cinasa C en procesos infecciosos ha sido sugerida por experimentos previos realizados con otros virus, tales como el virus del sarampión, en el cual se observa que la actividad intracelular de cinasa C se incrementa en la infección, sin embargo cuando se adicionan anticuerpos dirigidos contra

la proteína hemaglutinina, la actividad viral y de la proteína cinasa C son disminuidas a niveles basales (Segev *et al* , 1994), desafortunadamente información similar para algún otro miembro de la familia paramixovirus o el género rubulavirus no ha sido reportada, y únicamente evidencia experimental obtenida por mutaciones puntuales a este nivel podrían ayudar a identificar la función biológica de este patrón y en consecuencia confirmar la propuesta teórica.

De la misma manera el alineamiento múltiple nos permitió localizar para la HN de LPM ciertos patrones reportados como altamente conservados para las HN's de los paramixovirus (revisados por Morrison y Portner, 1991) y muchas teorías proponen que la preservación de estos patrones es debida a su carácter estructural y a la función enzimática que poseen. Un de ellos es el patrón NRKSCSI/V/L del residuo 233 al 239, y que en nuestro estudio estructural encontramos que este segmento para el caso de la HN de LPM se localizó dentro de una estructura asa (podría ser un giro-beta) y además en un segmento con una estructura tipo beta. El trabajo de Mirza *et al* (1994), induciendo mutaciones puntuales dentro de este patrón en la HN del virus de Parainfluenza I han mostrado alteraciones estructurales, las cuales promueven variaciones en antigenicidad, formación de sincicio, así como de una drástica inhibición de la actividad Neuraminidasa, sugiriendo que, en efecto, esta región es muy importante para esta actividad. Otro de los patrones altamente conservado es del residuo 398 al 403 que contiene a los aminoácidos GA/SEGRI/V/L, los cuales se encuentran definidos para el caso de la HN de LPM dentro de una estructura de tipo asa (podría ser un giro-beta) y parte de una estructura de tipo beta. Pero a diferencia del patrón anterior las mutaciones realizadas aquí, como se observó en la HN del virus de la enfermedad de Newcastle han demostrado que esta región posee una importancia fundamental en el procesamiento intracelular y en la actividad Hemaglutinante (Sergel, 1993). Y finalmente se identificó por primera ocasión, tanto para la HN de LPM como para las demás HN's, un nuevo patrón sumamente grande entre los residuos 464 al 475, y con la secuencia CPXXCI/V/LS/T/KGVYXD, sin una descripción previa o reportes acerca de su función o valor biológico.

El alineamiento múltiple permitió identificar tanto para la HN de LPM como para las demás secuencias HN's otro patrón sumamente conservados del residuo 315 al 320 (o 347 al 352), con los aminoácidos FXXYGGV/L/M, que conjuntamente con el patrón previamente detallado de los residuos 398 al 403 (o del 431 al 436) y con los residuos GA/SEGRI/V/L, evidenció la existencia entre ellos de un segmento de cerca de 90 residuos cuya diversidad de secuencias es grande y esta en relación con el tipo de virus, y que proponemos podría contener al dominio Hemaglutinina para todos los paramixovirus, 3 observaciones nos permiten apoyar esta propuesta 1) La organización de los patrones anteriores podrían

marcar el principio y fin del dominio, 2) El número de amino ácidos localizados dentro de los patrones anteriores, cerca de 90-100, es el número mínimo para considerar la existencia de un dominio y 3), La mutaciones puntuales realizadas en el patrón GA/SEGRI/V/L, para la HN del virus Newcastle evidenciaron una fuerte disminución de la actividad hemaglutinina.

Una vez que la estructura tridimensional de alguna proteína HN sea obtenida, será posible identificar la función de estos patrones y comprobar al mismo tiempo, la localización del dominio Hemaglutinina, y la participación de los aminoácidos localizados en su interior en el reconocimiento del carbohidrato.

El análisis de variabilidad con el índice de Jores (1990) a diferencia del índice de Wu-Kabat (1970), fue el mejor al definir más claramente a 5 regiones con valores altos de variabilidad en las secuencias HN incluyendo a la de LPM. La región que presentó los valores de variabilidad más altos en todo el perfil de variabilidad y posiblemente adyacente al potencial dominio transmembranal de LPM, se propone que podría estar implicada en la interacción a nivel extracelular con proteínas homólogas para la formación o el mantenimiento del tetramero funcional. La región de variabilidad 3 muy posiblemente podría estar comprometido en algún proceso antigénico, esto se deduce por la localización experimental cerca de esta región del péptido más inmunogénico para la proteína HN del virus Newcastle (lorio *et al.*, 1992) e incluso del péptido B identificado en esta tesis para la HN de LPM, lo que permite especular sobre la importancia de esta región, como una área antigénica, será entonces de sumo interés evaluar, las propiedades estructurales y antigénicas de esta zona en los diferentes miembros de la familia paramyxovirus.

Desafortunadamente la información existente hasta ahora no nos permite decir más sobre las implicaciones biológicas de las restantes regiones de las proteínas HNs, aunque la localización en el extremo carboxilo de las regiones 4 y 5, permite especular sobre su participación en un papel de variabilidad antigénica mas que de reconocimiento, debido a que se encuentran cerca del carboxilo terminal, alejado del dominio Hemaglutinina y de los motivos con función Neuraminidasa.

La variabilidad observada con el índice de Jores (1990), dentro del potencial dominio hemaglutinina permitió delimitar a diferencia del de Wu-Kabat (1978), la presencia de dos regiones con valores altos de variabilidad regiones 6 y 7, los cuales aunado al análisis de propiedades comunes de aminoácidos en cada posición, identificaron a 13 posiciones con una alta variabilidad y una propiedad fisicoquímica no común, y donde se propone que el papel biológico que podrían poseer tales residuos radica en el reconocimiento en fin de los carbohidratos-receptor, los cuales son altamente específicos para la especie del virus. También se observaron a 5 posiciones con variabilidad alta pero con una propiedad

fisicoquímica común, posiblemente y su papel biológico podría estar relacionado al reconocimiento general, (conformacional) del carbohidrato o estructural al sostener puentes de hidrógeno o ambientes hidrofóbicos los cuales pueden ser necesarios para mantener el correcto plegamiento del dominio. Finalmente se identificaron 7 posiciones conservadas con una propiedad fisicoquímica no común, y cuyo papel biológico no ha quedado bien establecido.

Si bien existen nuevos métodos que sustituyen la identificación arbitraria y subjetiva para la delimitación de regiones variables o conservadas dentro de una proteína tales como la utilización de filtrado de fourier (Jores, 1990), y filtrado algorítmico en escala espacial (Herrmann *et al.*, 1996) Este estudio combinado permitió identificar tanto para la HN de LPM como de las demás HN de los diversos paramyxovirus, los residuos con participación potencial en el reconocimiento del carbohidrato y al mismo tiempo con funciones estructurales, únicamente la evidencia experimental posterior mediante mutaciones en los diferentes niveles permitirá identificar el verdadero papel que poseen estos residuos, la ventaja derivada de este trabajo radica en que se podría implementar un diseño experimental más racional, al restringir el nivel de búsqueda y saber que residuos y por cuales propiedades modificar.

La utilización de tres algoritmos para la definición de regiones antigénicas a partir de la secuencia de amino ácidos de la HN de LPM, permitió en un principio la identificación de cerca de 15 péptidos inmunogénicos potenciales, la posterior estrategia que se utilizó, para seleccionar aquellas con mejores las propiedades y considerar además propiedades estructurales y fisicoquímicas, delimitó la definición a solo 2 péptidos, (péptido A y B). Mediante ensayos de ELISA el péptido B es reconocido por suero de cerdo infectado con el virus LPM, a una dilución del suero de 1:600, lo que habla del buen reconocimiento existente para este péptido. Por el contrario al compararse la respuesta con el péptido B con el péptido no definido como antigénico (péptido C), se evidencia una pobre respuesta de reconocimiento por el suero de animal infectado lo que permite concluir que el método para la identificación de epítopes inmunogénicos lineales de B es eficiente.

En la literatura se encuentran muchos reportes en los cuales se describe la obtención de proteínas periplásmicas o de membrana recombinantes y su utilización como acarreadores biológicos con potencial para el diseño de vacunas. Sin embargo la utilización de la proteína OmpC de *Salmonella typhi*, como un candidato para incorporar epítopes heterólogos y su incorporación a una bacteria acarreadora no ha sido referida, por lo que nuestros resultados nos han permitido establecer una nueva metodología para incorporar en el asa 5 de OmpC el epítope heterólogo HNA de LPM; sin aparente detrimento en la producción y expresión de la proteína recombinante, y al utilizar esta proteína recombinante con la bacteria

acarreadora en la inmunización por vía oral e intraperitoneal de ratones Balb-c, los anticuerpos obtenidos mostraron en ambos casos un buen nivel de reconocimiento para el virus LPM. Los anticuerpos obtenidos de animales inmunizados por vía oral poseen capacidad de inhibición de la actividad hemaglutinante, lo que confirma que mediante la utilización de la bacteria UH302 acarreadora del plásmido y la proteína recombinante pUC18-OmpCHNA, se logran generar anticuerpos con buena actividad biológica e inmunológica al reconocer e inactivar una de las propiedades biológicas del virus LPM; aunque no han sido evaluado los anticuerpos generados por este mecanismo podrían poseer actividad neutralizante del virus.

Es de hacer notar que los buenos títulos de anticuerpos contra el epítipo A de HN y en consecuencia el virus LPM, obtenidos en este trabajo utilizando el acarreador OmpC, se debieron a dos factores, 1) a la fuerte respuesta que origina por sí misma la proteína OmpC al contener al mismo tiempo epítopos de T que generan una respuesta celular importante, y 2) la correcta selección del epítipo HNA transferido, ya que este se encuentra considerado con una estructura de tipo beta-asa, con buenas propiedades fisicoquímicas tales como flexibilidad, y exposición al solvente y una longitud de 12 residuos, aproximadamente con las mismas propiedades y longitud que el asa 5 original de OmpC. Estos resultados preliminares abren toda una nueva línea de estudio para la utilización de la porina OmpC de *S. typhi*, al tener la posibilidad de incluir el mismo epítipo A o B, en otras asas antigénicas de la misma porina, originando una OmpC recombinante polivalente o monovalente, para uno o más epítopos, esto podría incrementar grandemente su efectividad como vacuna recombinante.

Es importante hacer una reflexión sobre la alta respuesta inmune que podrían generar algunos de los componentes o la bacteria vehículo de la proteína recombinante utilizada, los cuales podrían provocar una respuesta inmune dirigida preferentemente a componentes bacterianos como los lipopolisacáridos que no generan una memoria inmunológica, por lo que la sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante OmpC-HNA, así como su administración como elemento único podría ser una buena perspectiva, ya que esta proteína por sí sola ha demostrado ser capaz de inducir una buena respuesta inmune y que la cepa UH302 no mostró aparentemente efectos colaterales no deseados en la generación de una respuesta inmune eficiente contra el péptido HNA.

Recientes investigaciones han permitido concluir que los epítopos conformacionales preferentemente generan los mejores anticuerpos bloqueadores del virus, sin embargo nuestra primera aproximación nos permitió identificar dentro de toda la secuencia de aminoácidos de la proteína HN dos péptidos que poseen un buen nivel de inmunogenicidad, son reconocidos por suero de cerdo infectado con el virus completo y son capaces de

inhibir la actividad hemaglutinante lo que habla de las perspectivas de utilización para estos péptidos. Como último punto es importante recalcar la potencialidad en el uso de los algoritmos teóricos de manera combinada y sin dejar de considerar las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las proteínas, para localizar epitopes lineales de B importantes en generar una respuesta inmune.

VI CONCLUSIONES.

- El amino terminal es el principal implicado en el anclaje a la membrana, y la región carboxilo es la región extracelular que posee las funciones Hemaglutinante y Neuraminidasa así mismo la estructura secundaria se observó como un patrón alternado de hebras Beta-asas-hebrasBeta, interrumpidas ocasionalmente por alfa hélices, y que las propiedades de accesibilidad, flexibilidad e hidropatía muestran igualmente un patrón alternado, comprobando y profundizando la única propuesta de este tipo previamente planteada para las HN de otros paramixovirus y rubulavirus.

- El análisis de patrones de la proteína HN de LPM y el alineamiento múltiple de varias secuencias HN, incluyendo la LPM, permitió la identificación de un patrón intracelular de fosforilación, y otro patrón también intracelular, especie específico, posiblemente responsable de la asociación a la proteína cinasa o alguna otra proteína intracelular, así como la de ciertos patrones previamente caracterizados.

- La conservación en todas las secuencias HN's de ciertos patrones, la gran similitud entre las diferentes secuencias, la localización de varias regiones conservadas y variables (con potenciales implicación en la variación antigénica), permiten proponer que la estructura secundaria y posiblemente tridimensional de la HN's e incluido el LPM sea muy conservada entre los miembros del género y de que las funciones biológicas para estas proteínas se encuentran localizadas en dominios separados.

- La fórmula especialmente diseñadas para calcular variabilidad en inmunoglobulinas puede ser utilizado con buenos resultados en otras secuencias proteicas y mediante su empleo, localizar regiones variables y conservadas. Para el caso particular de las proteínas HN's aquí analizadas, cerca de 6 regiones variables fueron definidas para, sus implicaciones biológicas y antigénicas deberán ser evaluadas o confirmadas por posteriores trabajos experimentales.

-La utilización de 3 algoritmos teóricos para predecir epitopes antigénicos aunados a la caracterización estructural y fisicoquímica permitió identificar 2 epitopes de B, (péptido A y B), con un buen nivel de reconocimiento por suero de animales infectados con el virus LPM.

-El método empleado para la sustitución del asa 5 de la OmpC por un péptido heterólogo, permitió la obtención de una proteína recombinante (OmpC-HNA), que posee constitutivamente en su asa 5 el péptido A de la HN, el suero hiperinmune obtenido al inmunizar ratones con la construcción OmpC-HNA, mostró por una parte, un buen nivel de reconocimiento para el virus LPM por ELISA y por otra, una potencial actividad biológica e inmunológica al inhibir la Hemaglutinación del virus.

-Las perspectivas para la utilización de la proteína OmpC de *S. typhi* como un sistema eficiente de expresión de péptidos heterólogos y de la bacteria *E. coli* UH302 como un acarreador inocuo de la proteína de recombinante, basados en nuestros resultados se consideran de gran potencial, para el desarrollo de una vacuna contra el paramixovirus de la Piedad Michoacán.

VI REFERENCIAS

- Agüero J., Mora G., Mroczenski-Wildey M., Fernández M., Aron L., and Cabello, F. (1987). Cloning expression and characterization of the 36 Kda *Salmonella typhi* porin in *Escherichia coli*. *Microb. Pathogen.* 3:399-407.
- Almagro J.C., Vargaz Madrazo E., Zenteno-Cuevas R., Hernández-Mendiola V., and Lara Ochoa F. (1995). VIR: A computational tool for analysis of immunoglobulin sequences. *BioSystems*, 35: 25-32.
- Almagro J. C., Zenteno R., Vargas-Madrazo E., and Lara-Ochoa F (1995b). Variability analysis of the T-cell receptors using three variability indexes. *Int J Pept Protein Res* 45: 180-186.
- Baiocchi M., Pescarmona M., Gallina A., Dallochio F., and Tomasi M. (1993). Simple purification and secondary structure evaluation of sendai virus neuraminidase water soluble fragment. *Bioch. Mol. Biol. Int.* 31:389-398.
- Bairoch A. (1992) PROSITE: A dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic. Acid Res.* 20:2013-2018.
- Blumberg B., Giorgi C., Roux L., Raju K., Dowling P., Cholet A., and Kolakofsky D. (1985). Sequence determination of the virus HN gene and its comparison to influenza glycoproteins. *Cell* 41: 269-278.
- Böhm G. (1996). New approaches in molecular structure prediction. *Biophysical Chemistry.* 59:1-32.
- Boudet F., Theze J., and Zouali M., (1991). UV-treated polystyrene microtitre plates for use in ELISA to measure antibodies against syntetic peptides. *J. Immunol. Methods* 142:73-82.
- Cárdenas, L., and Clements, J.D. (1993). Stability immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. *Vaccine.* 11:126-135

-Carreon R., Fuentes M., Stephano H.A., y Ramirez M.H. (1989) Estudios preliminares del paramixovirus del ojo azul en la republica Mexicana. En: Doporto J.M., y Pérez P.F. (Eds.) Memorias Curso de Actualización en Enfermedades del Cerdo. Ed. UNAM-AMVEC, México, p. 78-82.

-Carbit A., Martineau P., Ronco J., Leclerc, Lo-Man R., Michel V., O'Callaghan and Hofnung M., (1993). Expression and immunogenicity of the V3 loop from the envelope of human immunodeficiency virus type 1 in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium* upon genetic coupling to two *Escherichia coli* carrier proteins. *Vaccine* 11 1221-1228.

-Chou P.Y., and Fasman G.D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13. 222-244

-Chou P.Y. (1989). In: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation Fasman GD, ed) Plenum Press, New York 12, 549-586.

-Cole S., Sonntag I., and Henning U. 1982. Cloning and expression in *Escherichia coli* K12 of genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 149:145-150.

-Colman P. M., Hoyne P.A., and Lawrence M.C. (1993). Sequence and structure alignment of paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase with influenza virus Neuraminidase. *J Virol* 67:2972-2980

-Cowan S., Chirmer G., Rummel G., Steiter M., Ghosh R., Pauptit R., Jansonius J., and Rosenbusch, J. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature* 358:727-733

-Deleage G., Clerc F.F., Roux B., and Gautheron D.C. (1988). Antheprot: A package for protein sequence analysis using a microcomputer. *Computer Appl. Biosci.* 4:351-356

-Deleage G., Tinland B., and Roux B. (1987). A computerized version of the Chou and Fasman method for predicting the secondary structure of proteins. *Anal. Biochem.* 163:292

- Deleage G, and Roux B. (1989) Use of class prediction to improve protein secondary structure prediction. In Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation (Fasman GD, ed) Plenum Press, New York 13, 587-597.
- Deshpande K.L., and Portner A (1984) Structural and functional analysis of Sendai virus nucleocapsid protein NP with monoclonal antibodies. *Virology* 139: 32-42.
- Deshpande K.L., and Portner A., (1985). Monoclonal antibodies to the protein HN of Sendai Virus define its structure and role in transcription. *Virology* 140. 125-134.
- Eisenberg D., Schwartz E., Komaromy M., and Wall R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179:125-142.
- Engvall, E and Perlmann, P.(1971) Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Immunochemistry* 8:874-879.
- Everest, P., Griffiths, P., and Dougan, G (1995). Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. *Biologicals*. 23: 119-124, 1995.
- Fuentes M., Carreón R., Stephano A., and Trujillo M. (1990) Frequency of Blue eye paramyxovirus in México Pigs. Proceedings 11th Congress, International Pig Veterinary Society, Lausanne, Suiza 1990
- Flöckner H., Braxenthaler M, Lackner, P., Jaritz M., Hortner, M., and Sippl, M.J. (1995). Progress in fold recognition. *Proteins*, 23 376-386
- Garnier, J., Osguthorpe D.J., and Robson B. (1978). Analysis of the accuracy and Implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol. Biol.* 120: 97-120.
- González C., Isibasi A., Ortiz-Navarrete V., Paniagua J., Garcia J. A., Blanco F., and Kumate J. (1993). Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 37:793-798
- Hansen J.E., Lund O., Nielsen J.O., Brunak S., and Hansen J.S. (1996). Prediction of the secondary structure of HIV-1 gp120. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 25: 1-11.

- Herrmann G., Schön A., Brack-Werner R., and Werner T. (1996) CONRAD a method for identification of variable and conserved regions within proteins by scale-space filtering *CABIOS* 12 (3): 197-203
- Higgins D.G., and Sharp P.M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer *CABIOS* 5:151-153
- Hofnung M. (1991) Expression of foreign polypeptides at the Escherichia coli cell surface *Methods Cel. Biol.* 34:77-105.
- Horsfall A.C., Hay F.C., Soltys A.J., and Jones G.M., (1991). Epitope mapping *Biosystems* 12:211-213.
- Hoop T.P., and Woods K.R. (1981). Prediction of antigenic determinants from amino acid sequences *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:3824--3828
- Huang R.T.C., Rott R., Whan K., Klenk H-D and Kohama T. (1980). The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by Paramyxoviruses. *Virology* 107. 313-319.
- Iorio R.M., Glickman R. L., and Sheehan J.P.(1992). Inhibition of fusion by neutralizing antibodies to the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus *Journal of General Virology* 73: 1167-1176.
- Isibasi A., Ortiz V., Moreno J., Paniagua J., Vargas M., González C., Garcia J., and Kumate J.(1988) The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever. In: *Cell function and disease*, Cañedo L.E., Todd L.E., Packer L., and J. Jaz, J. eds. Plenum Press, New York. pp. 281-292
- Isibasi A., Paniagua J., Rojo M., Martín N., Ramírez G., González C., Lopez C., Sánchez J., and Kumate J. (1994) Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity *Ann. N.Y. Acad. of Sci.* 730:350-353.
- Jeantur D., Lakey J.H., and Pattus F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction *Mol. Microbiol.* 5:2153-2164.
- Jimenez-Montaña M.A. (1984). On the syntactic structure of protein sequence and the concept of grammar complexity. *Bull. Math Biol.* 46: 641-659.

- Jores R., Alzari P.M., and Meo T. (1990). Resolution of hypervariable regions in T-cell receptor β -chains by a modified Wu-Kabat index of amino acids diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 9138-9142.
- Kabshs W., and Sander C. (1983). Dictionary of protein secondary structural pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymer* 22:2577-2637.
- Kingsbury D.W. (1990). Paramyxovirus and their replication. In: *Virology* (Fields B.N., Knipe D.M., Eds.), Raven Press, New York, p. 945-961.
- Klein P., Kanehisa M., and Delisi C. (1985). The detection and clasification of membrane spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 815:468-476.
- Kyte J., and Doolittle R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Leclerc C., Martineau P., Van der Werf S., Deriaud E., Duplay P., and Hofnung M. (1990). Induction of virus-neutralizing antibodies by bacteria expressing the C3 poliovirus epitopes in the periplasm. *Journal of Immunology* 144: 3174-3182
- Linné T., Berg M., Bergvall A.C., Hjertner B. and Moreno-Lopez J. (1992). The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPM. *Vet. Microbiol.*, 33:263-273.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1958). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275,1951.
- Levitt M. (1978). Comformational preferences of aminoacids in globular proteins. *Biochemistry*, 17:4277-4285.
- Martínez L. A., Correa-Girón P., Fajardo M.R., y Garibay M., (1985). Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. En: Morilla A., Correa P., y Stephano A., (Eds.) *Avances en las enfermedades del Cerdo*. Ed. AMVEC-UNAM, México, D.F., pp. 313-319.

- Mirza A., Deng R., and Iorio M (1994). Site-directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. Effects on antigenic structure and function. *J of Virol.* 68: 5093-5099
- Moreno-Lopez J., Correa-Giron P., Martinez A., and Ericson A (1986). Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch. Virol.* 91: 221-231.
- Morrison T.G. and Portner A. (1991). Structure, function, and intracellular processing of the glycoproteins of Paramyxoviridae. In: D.W. Kingsbury, *The Paramyxovirus*, pp. 347-382. Plenum New York
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., and Summer M.D. (1996). *Virus Taxonomy, Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses.* 586 pages. Wien New York Springer-Verlag eds.
- Murty F.K.G., Takimoto T., Llavero W.G., and Portner A. (1993). Crystal of hemagglutinin neuraminidase of parainfluenza virus contains triple-stranded helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1523-1525.
- Nikaido H. (1983). Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods Enzymol.* 97: 85-100.
- Nikaido H., Vaara M., Neidhardt F., Ingraham J., Low K., Magasanik B., Chaechter M., and Umberger H. (1987). *Outer Membrane. Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* In: *Cellular and molecular Biology.* American Society for Microbiology Washington, D.C., pp. 7-22
- Overbeeke N., Bergmans H., van Maxsfeld F., and 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
- Paniagua J., Martin N., Ortiz V., Mui M., González C.R., and Isibasi A. (1995). Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Infect. Dis* 5: 244-249

- Parker J.M., Goo D., and Hodges R.S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray derived accessible sites. *Biochemistry* 25: 5425-5432.
- Portner A., Scroggs R.A., and Metzger D.W. (1987). Distinct functions of antigenic sites of the HN glycoprotein of Sendai virus. *Virology* 158:61-68.
- Pomeroy C., and Jordan M.C. (1992). Mumps En. Hoeplich P.D., and Jordan M.C. (Eds). *Infection Diseases* 4th ed. Raven press, New York, 789-804.
- Rao M., and Argos A. (1986). A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochem Biophys. Acta* 869:197-214.
- Reyez Leyva J., Hernández-Jauregui P., Montaña L.F., and Zenteno E., (1993). The porcine Paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (α 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 133:195-200.
- Rost B., and Sander C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232:584-99
- Rost B., and Sanders C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins*, 19:55-72.
- Rost B., Sanders C., and Schneide R. (1994). PHD-an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Comput. Appl. Biosci.* 10:53-60. Rost B. (1995). In: Rawlings C., Clark D., Altman R., Hunter L., Lengauer T., and Wodak S. (eds.) "The third international conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB)", Cambridge, U.K., Jul 16-19, Menlo Park, CA. AAAI Press, 314 -321.
- Sambrook K.J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. pp. 1.42-1.46, 1989.
- Sanders C., and Rost B. (1993). Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:7558-7562
- Segev Y., Rager-Zisman B., Isakov N., Schneider-Chaulies S., Ter Meulen V., Udem S.,

- Segal S., and Wolfson M. (1994) Reversal of the measles virus mediated increase of phosphorylating activity in persistently infected mouse neuroblastoma cells by anti-measles virus antibodies. *J. Gen. Virol.* 75:819-827
- Sergel T., McGinnes L., and Morrison T. (1993). Role of a conserved sequence in the maturation and function of the NDV HN glycoprotein. *Virus Res.* 30:281-294
- Simonet M., Fortineau N., Beretti J.L., and Berche, P. (1994). Immunization with live *aroA* recombinant *Salmonella typhimurium* producing invasins inhibits intestinal translocation of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 62:863-867.
- Stephano H.A., Gay G.M., Ramírez T.C., y Maqueda A.J. (1981). Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *Memorias XVII Reunión, asociación Mexicana de Veterinarios*
- Stephano H.A., y Gay G.M., (1983). El síndrome del ojo azul, estudio experimental. *Memorias Reunión Nacional de investigación pecuaria en México, México D.F.*, p. 523-526.
- Stephano H.A., y Gay G.M. (1985). Síndrome del Ojo azul. en Morilla A., Correa P., y Stephano A., (Eds). *Avances en las Enfermedades del Cerdo*. Ed. AMVEC, México D.F., pp. 299-311.
- Sugawara K., Nishimura, Hongo S., Muraki, Y., Kitame F. and Nakamura K. (1993). Construction of an antigenic map of the haemagglutinin-esterase protein of influenza C virus. *J. Gen. Virol.* 74: 1661-1666.
- Sundqvist A., Berg, M., Hernández-Jauregui, P., Linné T. and Moreno-López J. (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.*, 71:609-613.
- Sundqvist A., Berg M., Moreno-Lopez J., and Liné T. (1992). The Hemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to Simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol.* 122:331-340.

- Takimoto T., Laver W.G., Murti K.G. and Portner A. (1992). Crystallization of biologically active hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein dimers proteolytically cleaved from human parainfluenza virus type 1. *J Virol* 66:7597-7600.
- Venegas A., Gómez I., Zarror I., and Yuldelevich A. (1988). The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* OmpC porin gene. *Nuc. Ac. Res.* 16:7715-7721.
- Welling G.V., Weijer W.J., Van der Zee R., and Welling Wester S. (1985) Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 188:215-218.
- Wu, T.T., and Kabat E.A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* 132:211-250.
- Yewdell J., and Gerhard W. (1982). Delineation of four antigenic sites on a paramyxovirus glycoprotein via which monoclonal antibodies mediate distinct antiviral activities. *J. Immunol.* 128(6):2670-2675.
- Zhang, T., and Stanley, S.L. (1996). Oral immunization with attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* expressing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein induces an antiamebic immune response and protects gerbils from amebic liver abscess. *Infect. Immun.* 64:1526-1531.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA