

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

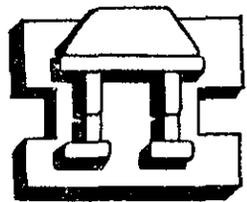
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN VECTOR PARA
LA EXPRESION DE EPITOPOS DE *Omp C*, EN EL
EXTREMO AMINO TERMINAL DE LA SUBUNIDAD B
DE LA TOXINA DEL COLERA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ISMAEL SECUNDINO VELAZQUEZ

ASESOR: DR. JORGE F. PANIAGUA SOLIS



IZTACALA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 1998

260569



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 27 de noviembre de 1998.

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD
DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología:

ISMAEL SECUNDINO VELAZQUEZ

titulado:

"Diseño y construcción de un vector para la expresión de epitopos de Omp C, en el extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina del cólera".

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA

M. EN C. RAMON V. MORENO TORRES

BIOLOGO ELIAS PIEDRA IBARRA

DR. JORGE PANIAGUA SOLIS

M. EN C. SERGIO VACA PACHECO

(Nombre completo)

(Firma)

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, bajo la asesoría del Dr. Jorge F. Paniagua Solís.

Parte del trabajo fue también realizado en el Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, en el laboratorio del Dr. Joaquín Sánchez Castillo.

LO QUE SOÑASTE ANOCHE,
lo que quieres, está
tan cerca de tus manos, tan imposible
como tu corazón,
tan difícil como apretar tu corazón
Lo que anoche, Tarumba, viento de sueño,
sombra de sueño, creció arrebatándote,
era tu paz, era
la larga música del vidrio de tus venas.

* * *

AL PIE DEL DÍA,
de la mano de una madre estelar,
mi corazón sonrío y espera,
como esos niños de ojos grandes y misteriosos,
tocado de gracia, mi corazón
mira en las cosas las profecías cumplidas.
Dueño de mi corazón que me sostiene,
estoy pensando en el riguroso vivir
mientras la hora descende hasta la soledad radical
de mis huesos sobrevivientes
Ésta es mi substancia comunicada,
ni dentro ni fuera de mí, yo mismo,
un mismo aire, yo, surtidor del mundo.
Soy exacto en el contorno de todas las cosas,
este hombre, esta limitación.

JAIME SABINES.

DEDICATORIAS:

A MI MADRE BERTHA:

Por haberme otorgado la vida, por brindarme tu apoyo siempre, por estar junto a mí, por alentarme para superarme día con día dándome una carrera universitaria. Porque este trabajo no lo hubiese realizado sin tu ayuda...

Gracias, mil gracias.

A MI TÍO JOSÉ:

Por ayudarme siempre que te lo pedía, por apoyarme ya sea con un consejo o económicamente. Y aunque no eres mi padre biológico, te considero como mi verdadero padre... Gracias.

A MI HERMANO ARMANDO:

Por cuidarme, ayudarme y estar conmigo.

A MI TÍO MACARIO (Q.E.P.D.):

Que me brindó su apoyo y ayuda. Te dedico este trabajo muy especialmente...Gracias.

Y A TODA MI FAMILIA:

A mis demás tíos: Adelaido, Victoria; a mis primos: Hugo, Angélica, Lourdes, Bertha, Guadalupe, Alicia y Carlos. Y al pequeño Beto.

AGRADECIMIENTOS:

A mis compadres de la preparatoria: Basilio, Roberto L. y Roberto R., por brindarme largos años de amistad que aún perdura.

A mis amigos de la carrera: Yeini, Charlotte, Karla y Fernando y, muy en especial a Uri; por haberme brindado su compañía, apoyo y haberme aguantado durante estos últimos años.

A una persona especial, por estar conmigo y ser mi amiga. Espero que estos momentos duren aún más.

Al Dr. Jorge F. Paniagua S., por darme la oportunidad de realizar este trabajo y su gran ayuda.

Al Dr. Joaquín Sánchez C., por su valiosa asesoría y acertados comentarios.

Al Dr. Armando Isibasi A., por haberme permitido formar parte de su laboratorio.

Al Dr. Vianney Ortiz N., por sus consejos y apoyo en el laboratorio.

A todos mis compañeros de la UIM en Inmunoquímica: Rocío, Bernardo, Daniel, Genaro, Rosita, Adriana, Jorge G. (peine 2); Rebeca, Tere, Natalia, Víctor, Penélope, Irma, Gaby, Gary, Lolita, Alberto, Rosana (peine 3); Roberto, Araceli, Fernando, Sara, Mario, Manuel (peine 1).

CONTENIDO.

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	ii
Abreviaturas	iii
Resumen.....	v
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Proteínas de la Membrana Externa (PME)	
1.1.1 Generalidades	
1.1.2 Componentes	
1.1.2.1 Fosfolípidos	
1.1.2.2 Lipopolisacárido (LPS)	
1.1.2.3 Proteínas	
II ANTECEDENTES.....	5
2.1 Porinas	
2.1.1 Inmunogenicidad de las porinas de <i>Salmonella typhi</i>	
2.1.2 Modelo topológico para la porina OmpC de <i>Salmonella typhi</i>	
2.2 Toxina del cólera (CT)	
2.2.1 Subunidad B de la toxina del cólera (CTB)	
2.2.2 Subunidad A de la toxina del cólera (CTA)	
2.2.3 Inmunogenicidad de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB)	
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos particulares	
V MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
VI RESULTADOS.....	35
VII DISCUSIONES.....	41
VIII CONCLUSIONES.....	46
IX BIBLIOGRAFÍA.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la organización de los principales componentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas.....	3
Figura 2. Estructura del monómero de la porina Omp F de <i>Escherichia coli</i>	8
Figura 3. Modelo topológico de la porina OmpC de <i>Salmonella typhi</i>	15
Figura 4. Esquema de la estructura secundaria de la subunidad B de la toxina del cólera.....	19
Figura 5. -Mapa del vector plasmídico pJS752-3.....	27
Figura 6. Mapa del plásmido pBR322.....	28
Figura 7. Productos de la amplificación mediante PCR.....	36
Figura 8. Mapa de reestricción del vector pCTBtet.....	36
Figura 9. Mapa del plásmido pCTBtet (amp^r , tet^r).....	37
Figura 10. Mapa de reestricción de los genes de fusión de las asas 1,2,3,4,5,6,7 y 8.....	39

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Principales componentes de la membrana externa.....	2
Tabla 2. Propiedades generales de las porinas.....	6
Tabla 3. Detección de las proteínas híbridas mediante el empleo del anticuerpo LT39 anti-ctb.....	40

ABREVIATURAS.

amp	Ampicilina
amp ^r	Ampicilina resistente
BSA	Albúmina sérica bovina
CT	Toxina del cólera
CTB	Subunidad B de la toxina del cólera
<i>ctb</i>	Gene de la subunidad B de la toxina del cólera
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
GM1	Monosialogangliósido GM1
Kda	Kilodaltones
Kpb	Kilo pares de bases
N-terminal	Extremo amino terminal
Omp	Proteínas de la membrana externa (por sus siglas en inglés - outer membrane protein-).
OmpC	Proteína de la membrana externa Omp C, presente en bacterias gram-negativas.
OmpC _r	Proteína de la membrana externa OmpC recombinante.
<i>ompC</i>	Gene de la porina OmpC
OPD	Orto-fenilendiamina.
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pCTB-L1	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 1 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTB-L2	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 2 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTB-L3	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 3 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTB-L4	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 4 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTB-L5	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 5 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTB-L6	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 6 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTB-L7	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 7 de <i>ompC::ctb</i> .

pCTB-L8	Vector plasmídico que contiene el gene de fusión de la asa 8 de <i>ompC::ctb</i> .
pCTBtet	Vector plasmídico que contiene el gene <i>ctb</i> y resistencia a amp y tet
pJS752-3	Vector plasmídico que contiene el gene <i>ctb</i>
Porina	Proteína que forma poros en la membrana externa de las bacterias gram-negativas.
PME	Proteínas de la membrana externa
tet	Tetraciclina
tet ^r	Tetraciclina resistente
tet ^s	Tetraciclina sensible

RESUMEN.

El empleo de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) como adyuvante es de especial interés para aumentar la respuesta inmune humoral y en mucosas; sin embargo, recientemente se ha propuesto que CTB induce tolerancia. Este aumento de la respuesta inmune ha consistido mediante la co-administración, unión química, o fusión genética al antígeno de interés. Siendo esta última alternativa una buena estrategia, mediante la construcción de genes híbridos para expresar proteínas de fusión con epitopes en el extremo amino terminal (N-terminal) de CTB; éstas incluyen el decapeptido de la enterotoxina termolábil A (St_a) de *E. coli*, un péptido de glucosiltransferasa B (GtfB) de *Streptococcus mutans*, un dodecapeptido de *Entamoeba histolytica*, el epitopo (296-313) de la proteína VP4 del rotavirus humano y, el asa 6 y 7 de la porina OmpC de *Salmonella typhi* que corresponden a los segmentos 246-255 y 290-303 de esta proteína. El vector que se empleó para la expresión de los epitopes de OmpC y el rotavirus fue el plásmido pJS752-3 (amp^r), mediante la clonación de los oligonucleótidos que codificaban para estos péptidos entre los sitios Sac I y XmaI en el vector pJS752-3; sin embargo la digestión de ambos sitios es difícil porque se sobrelapan. Por ello como estrategia se construyó un nuevo vector, mediante la inserción de un segmento de DNA para que estos sitios se alejaran. Esta construcción se denominó CTBtet (amp^r tet^r) porque el segmento de DNA que se insertó fue el gene de tetraciclina (tet), consecuentemente las bacterias transformadas con este plásmido crecen en presencia de ampicilina y tetraciclina; además se sacó de marco de lectura a CTB, debido a que se clonó

tet, con su propio promotor, antes de que iniciara el gene *ctb*. El vector pCTBtet presentó nuevas ventajas para la construcción de genes híbridos y rastreo de las proteínas híbridas producidas, entre estas tenemos las siguientes: i) la separación de los sitios SacI y XmaI que facilitó la digestión; ii) el reemplazo de cualquier oligonucleótido que codificara para algún epítipo de interés por el gene de tetraciclina; iii) el rápido y fácil rastreo de 8 genes de fusión que expresaron las regiones externas de la porina OmpC de *Salmonella typhi* en el extremo N-terminal de CTB, mediante la pérdida de resistencia a tetraciclina (fenotipo) y/o restitución del marco de lectura de CTB y detección de las proteínas híbridas mediante ELISA-GM1; iii) este rastreo evitó la purificación del DNA y/o detección de las proteínas híbridas como primer paso y, únicamente se realizó esto al final para caracterizar las construcciones obtenidas.

Las 8 asas (regiones externas) de OmpC que se expresaron fueron: la asa 1 (L1) SDDKGSDDGD; 2 (L2) GNQTEGSNDSWT; 3 (L3) PEFGGDTYGADNFMQQRGN; 4 (L4) KNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYG; 5 (L5) RTADQNNTANARLYGDRA; 6 (L6) GTSNGSNPSTSYGFAN; 7 (L7) DISNGYGASYGDNI; y 8 (L8) LLDKNDFTRDGINRDD.

En conclusión, el nuevo vector que se construyó (pCTBtet) permitió el rápido y fácil rastreo de 8 construcciones que expresaron de 9-24 aminoácidos en el extremo N-terminal de CTB. Además la conformación de las proteínas híbridas no se alteró porque CTB reconoció a su receptor GM1, mediante la técnica de ELISA-GM1. Este plásmido permitirá expresar epítopos unidos a CTB que se

I INTRODUCCIÓN.

1.1 PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (PME).

1.1.1 GENERALIDADES.

Las membranas de las células y organelos desempeñan una función importante en la separación del ambiente interno y externo celular; además permiten el paso de los nutrientes y productos de desecho, así como la comunicación con el ambiente externo. Para efectuar estas funciones, las membranas han desarrollado vías de comunicación y transporte que consisten en receptores y canales (1).

Las bacterias gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos, poseen dos membranas lipídicas (designadas membrana interna y membrana externa). Estudios mediante microscopía electrónica en bacterias gram-negativas mostraron que la membrana externa está situada hacia afuera de la capa de peptidoglicana (1).

La membrana externa de las bacterias gram-negativas es una estructura altamente especializada que las protege del medio externo, pero a su vez debe permitir un intercambio de solutos necesarios para el microorganismo. Además, puede poseer receptores para bacteriofagos y colicinas y, es importante en el reconocimiento célula-célula durante la

conjugación. Estas especializadas funciones de la membrana se deben principalmente a su composición y organización (2) .

1.1.2 COMPONENTES (3).

La membrana externa de las bacterias gram-negativas se compone de lípidos, lipopolisacárido (LPS) principalmente (figura 1) y, proteínas con características bien definidas (Tabla 1). Además la membrana externa de la familia *Enterobacteriaceae* posee un polisacárido único, el antígeno común enterobacterial (3).

TABLA 1.

	Moléculas/célula (10^5)	Área superficial (mm^2)
Lipopolisacárido (LPS)	34.6	4.9
Porinas	2	1.8
Lipoproteínas	7	0.5
Fosfolípidos	87	4.1

Tabla 1. Principales componentes de la membrana externa. Tomado de Nikaido, H. y Vaara, M., 1987 (3).

1.1.2.1 FOSFOLÍPIDOS.

La composición de fosfolípidos de la membrana externa y citoplasmática es muy similar, excepto que existe mayor concentración de fosfatidiletanolamina en la membrana externa.

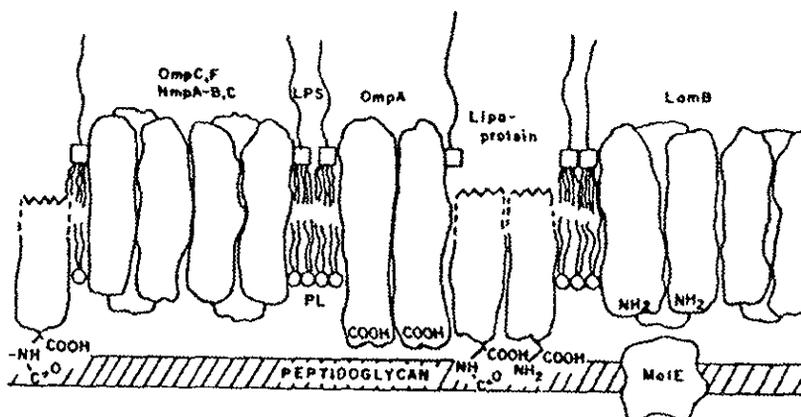


Figura 1. Esquema de la organización de los principales componentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Tomado de Osborn, M.J. y Wu, H.C.P., 1980 (2).

1.1.2.2 LIPOPOLISACARIDO (LPS).

El LPS o endotoxina es el principal constituyente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas y no se encuentra en alguna otra parte de la célula procarionte, excepto como intermediario biosintético. El LPS se compone de tres partes: la región hidrofóbica del lípido A (proximal), la zona hidrofílica del antígeno O polisacárido (distal); y la región del polisacárido *core* que une a la región del antígeno O y el lípido A.

1.1.2.3 PROTEÍNAS.

Las proteínas de la membrana externa poseen características especiales que difieren de las proteínas de la membrana citoplasmática, su

estructura conformacional es en forma de hojas β -plegadas o hélices- α (4). Las principales son las porinas, la lipoproteína mureína y ompA.

Porinas. Las porinas son trímeros constituidos por subunidades idénticas, cada subunidad presenta una estructura en forma de hojas β -plegadas; éstas son una de las más abundantes proteínas en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* en masa, y representan arriba del 2% de la proteína total de estas bacterias. Funcionan como canales de difusión facilitada para moléculas de bajo peso molecular (600 Kda) a través de la membrana externa.

Lipoproteína mureína (lipoproteína de Braun) . Ésta es una pequeña proteína (7,200 dalton) que se presenta en alto número de copias (7×10^5 /célula). Aproximadamente una tercera parte de esta proteína se encuentra unida covalentemente a la capa de peptidoglicana mediante su grupo ϵ -amino de la lisina del carboxilo terminal, y el resto se localiza como proteína libre. Su principal función es mantener la integridad estructural y funcional de la membrana.

Proteína OmpA. Su número de copias es de aproximadamente 10^5 /célula, se presenta como un monómero cuya estructura está constituida por hojas β -plegadas. Es un receptor para fagos y colicinas.

Otras proteínas. Algunas enzimas se encuentran en la membrana externa, entre ellas tenemos la fosfolipasa A1 y otras proteasas.

La primera porina aislada para su caracterización fue OmpF de *E. coli*. La forma funcional de esta proteína es un trímero. Las principales porinas de *E. coli* (OmpF, OmpC, y PhoE), *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodopseudomonas blastica* poseen masas moleculares entre 30-50 kDa/monómero (3). En la tabla 2 se señalan algunas de las características de esta clase de proteínas transmembranales.

TABLA 2.

Porina.	Forma funcional.	Propiedades de transporte		
		Modo.	Límite de exclusión aproximado (Da).	Selectividad.
<i>Escherichia coli</i>				
OmpF	Trímero	Pasivo	600	Debilmente cationico
OmpC	Trímero	Pasivo	600	Debilmente cationico
PhoE	Trímero	Pasivo	600	Debilmente anionico
LamB	Trímero	Específico, pasivo	600	Específico para maltodextrina
OmpA	Monómero	Pasivo	600	No detectado
<i>Rhodopseudomonas blastica</i>				
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Trímero	Pasivo	1,000-2,000	Fuertemente cationico
Mitocondria (VDAC)		Pasivo	4,000-5,000	Estado "abierto" debilmente anionico Estado "cerrado" debilmente cationico
Cloroplasto		Pasivo	10,000	

Tabla 2. Propiedades generales de las porinas. Tomado de Jap. B.K. y Walian, P.J., 1996 (1)

Debido al alto grado de hidrofobicidad de las porinas, no se posee mucha información acerca de la estructura cristalográfica de la mayoría de estas proteínas transmembranales. No obstante, la primer porina en cristalizarse dando los primeros datos preliminares sobre su estructura mediante difracción de rayos X, fue OmpF de *E. coli*, ésta fue obtenida por Garavito y Rosenbusch (12). Posteriormente se determinó la estructura completa, mediante difracción por rayos X, con resolución de 2.4 Å y 3.0 Å de las porinas OmpF (figura 2) y PhoE de *E. coli* respectivamente y, de una porina de *Rhodobacter capsulatus* por Cowan y col. (13) y Weiss y col. (14). Demostraron que son trímeros compuestos de subunidades idénticas, cada subunidad consiste en 16 β -plegadas antiparalelas y por largas asas con algunas α -hélices intercaladas. Cada monómero expone 8 asas ("loops") internas pequeñas hacia el espacio periplásmico y 8 asas largas situadas hacia el exterior de la membrana externa. Estos monómeros, en forma de cilindro, se forman al cerrarse las estructuras β de manera pseudo-cíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1.

La entrada del poro la delimitan largas prolongaciones del cilindro que, al inclinarse hacia el centro del canal, restringen su acceso; a la mitad de la altura, el diámetro del poro se reduce por el doblamiento de una de sus paredes hacia el interior; esta zona de restricción determina el paso de las moléculas de diferente tamaño y polaridad. El poro se vuelve a abrir y conserva sus dimensiones hasta el otro extremo que desemboca en el espacio periplásmico de la bacteria (13).

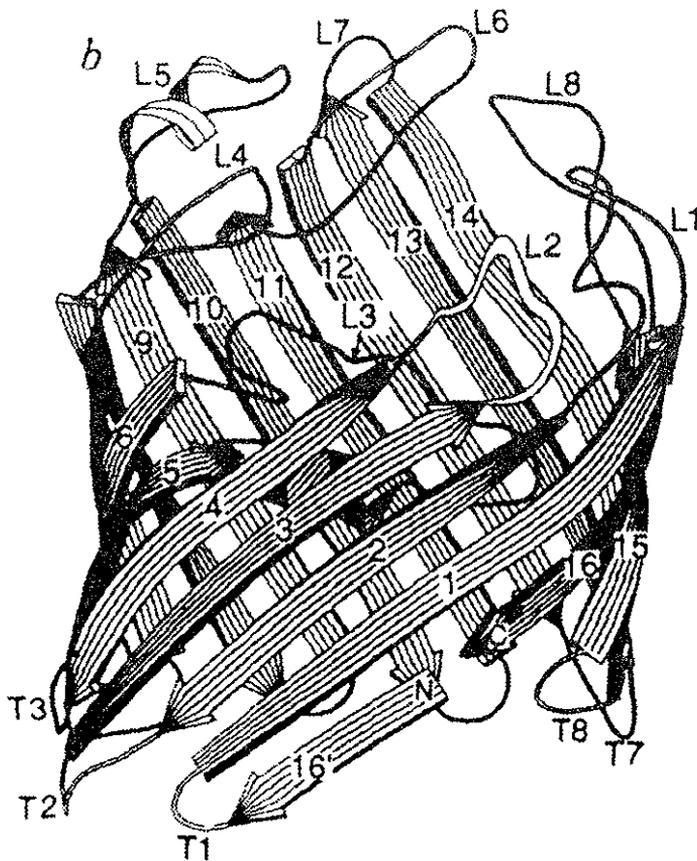


Figura 2. Estructura del monómero de la porina Omp F de *Escherichia coli*. Las flechas representan las hojas β -plegadas (1-16); las 8 asas largas (*loops*) que se exponen hacia el medio externo se señalan como L1-L8; y las 8 asas cortas (*turns*) que se exponen hacia el espacio periplásmico se abrevian como T1-T8. Tomado de Cowan y col., 1992 (13).

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, que está rodeado por dos "cinturones" de aminoácidos aromáticos que por su interacción con la membrana le permiten, a la porina, anclarse a la misma (8). La entrada del poro está restringida por las asas

largas y disparejas que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11-19 Å. La salida del poro al espacio periplásmico, en cambio, tiene dimensiones de 15 X 22 Å, y está definido por vueltas β . El mayor número de modificaciones en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas, y por tanto son éstas las responsables de la diferencia en el tamaño de la entrada de los poros (13). La estructura del trímero se forma mediante el entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas β 1-5 y β -16, donde los diez residuos carboxilo de la región β -16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y la estabilidad de la porina (15,16).

Recientemente, ya se reportó la cristalización de una porina de *Paracoccus denitrificans* a 3.1 Å de resolución, y posee una estructura muy semejante a la descrita para las porinas de *E. coli* y *Rhodobacter capsulatus* (17).

En *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* se han identificado a las porinas OmpC y OmpF, y a una tercera porina PhoE la cual posee preferencia por solutos con carga negativa como el fosfato; además, existe la porina Omp D que sólo se presenta en *S. typhimurium* (3). La cantidad total de estas proteínas es relativamente constante; se señala que las porinas son una de las más abundantes proteínas en estas bacterias, en masa total representan arriba del 2% de la proteína de la célula (3). En condiciones de laboratorio, *Salmonella typhi* sintetiza tres proteínas de la membrana externa: OmpC, OmpF y OmpA (18); además el gene *ompc* de

S. typhi ya se secuenció (19,20), consiste en 1134 nucleótidos que codifican para una proteína de 378 aminoácidos, de los cuales 21 aminoácidos corresponden a la secuencia líder, posee una homología del 79% en la clase de aminoácidos y del 77% en la secuencia de nucleótidos con respecto a la proteína OmpC y el gene *ompC* de *E. coli*.

Las regiones más conservadas de OmpC son los segmentos β -transmembranales y los más variables son las asas externas (21,22,23). Las mismas características se sugieren para OmpF (24), OmpD (23) y una proteína principal (PI) de la membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* que se propone que está bajo presión positiva Darwiniana (25).

Se ha señalado que la cantidad relativa de las principales proteínas de la membrana externa en *E. coli* y *S. typhimurium*, las porinas OmpF, OmpC y PhoE son regulada por las condiciones del medio como son la osmolaridad, temperatura, pH, concentración de fosfatos y disponibilidad de oxígeno. La regulación recíproca de las porinas se ha propuesto como una respuesta adaptativa de estas bacterias a diferentes habitats. En un medio con pobre contenido de nutrientes y baja temperatura, la porina OmpF se expresa preferentemente; en cambio, la expresión de OmpC se efectúa cuando la bacteria crece en un medio con alto contenido de nutrientes, como el intestino de un hospedero de mamífero, donde se presentan condiciones de alta salinidad, alta temperatura y baja disponibilidad de oxígeno. En otras condiciones de crecimiento, la expresión de OmpC y OmpF de *S. typhi* se reprime en un medio mínimo, conforme se incrementa la osmolaridad; no obstante, en medio Luria la expresión de OmpC se

incrementa ligeramente bajo una osmolaridad arriba de 0.3 osmM (26). Estos resultados difieren de los reportados previamente, donde sugirieron que OmpC de *S. typhi* no se regula debido a la baja osmolaridad del medio (0% sucrosa), o alta (20% sucrosa) (27). Pho E únicamente se expresa bajo condiciones de escasez de fosfatos (3). La concentración de oxígeno influye en la expresión de las porinas, en anaerobiosis OmpC se induce en *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli*; sin embargo, OmpF se reprime por anaerobiosis en *E. coli* y *S. typhi*. Con respecto a la temperatura, cuando ésta cambia de 30°C a 37°C, OmpF se induce en *S. typhi*, mientras que esta porina se reprime en *E. coli* (26). La expresión de estas porinas se regula mediante el operón *ompB* que codifica para las proteínas OmpR y EnvZ (27,28). Recientemente, se señalaron varios genes e inductores que regulan la expresión de las porinas como lo son el gene *secB*, el inductor *gcvA* y el el represor *rbsR* (29).

2.1.1 INMUNOGENICIDAD DE LAS PORINAS DE *Salmonella typhi*.

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

Se ha demostrado que estas proteínas estimulan mecanismos efectores humorales y celulares en el modelo murino y que son buenos

inmunógenos para la inducción de un estado de protección contra la infección por la bacteria (30,31,32).

Se comprobó que un suero anti-proteínas de membrana externa (PMEs) de *S. typhi*, empleado para inducir la protección pasiva en ratones, reconoció con mayor intensidad a las porinas de las diferentes cepas de *Salmonella* utilizadas en un ensayo de inmuno-electrotransferencia. Este hecho mostró que las porinas podían ser los antígenos responsables de la inducción de protección (30).

Más adelante la inmunización con cantidades tan pequeñas como 10 μg de porinas purificadas de *S. typhi*, confirió protección al 90% de los ratones NIH retados con 500 DL_{50} de la bacteria homóloga. En cambio no se indujo protección al reto con *S. typhimurium* en las mismas condiciones, lo que demuestra una respuesta especie-específica a las porinas (32).

El empleo de anticuerpos monoclonales de isotipo IgM anti-porinas de *S. typhi* 9,12,Vi:d confirió una protección del 60% al reto con 20 DL_{50} en el modelo murino (33), mientras que los anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido no indujeron protección (34).

Las porinas de *S. typhi* son también inmunogénicas en el humano. Esto se demostró cuando, al evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes con fiebre tifoidea en fase convaleciente, se encontraron anticuerpos de clase IgG dirigidos contra las porinas (35). De igual modo, la

administración de la vacuna antitifoídica oral indujo la producción de anticuerpos anti-porinas en las personas estudiadas (36).

Se demostró que las porinas de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *E. coli* son capaces de inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos de ratones NIH inmunizados con PME de *S. typhi*; y más aún, que la respuesta a las porinas de *S. typhi* no se debió a la presencia de LPS (32).

La porina OmpC recombinante (OmpC_r) es capaz de inducir una protección del 30% al reto con 100 DL₅₀ de la bacteria viva (*S. typhi*) en un modelo murino (37)

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

2.1.2 MODELO TOPOLÓGICO PARA LA PORINA OmpC DE *Salmonella typhi*.

Por estos motivos, es importante determinar las regiones antigénicas de la porina OmpC de *S. typhi*. Debido a que no se posee información de su estructura cristalográfica, se cuenta con varios métodos para llevar a cabo la predicción de epitopos. Estos métodos consisten en localizar los determinantes antigénicos de las proteínas, mediante el análisis de la

secuencia de aminoácidos con el objeto de hallar los puntos de mayor hidrofiliidad; esto se realiza mediante la asignación de un valor numérico a cada aminoácido (valor de hidrofiliidad) consecutivamente a lo largo de la cadena polipeptídica. El punto en promedio, de la más alta hidrofiliidad local, se localiza en el sitio, o cercano a él del determinante antigénico (38).

Mediante este procedimiento, Martín, O. (manuscrito en preparación) alineo y comparó la secuencia de la porina OmpC de *E. coli* y *S. typhi*, apoyándose con el modelo cristalográfico de la porina OmpF de *E. coli*. Además mediante el análisis computacional predijo la estructura secundaria para OmpC de *S. typhi*, donde estableció la presencia de ocho asas externas (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 y L8), ocho asas internas (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8) y 16 segmentos transmembranales de la porina OmpC de *S. typhi* (figura 3).

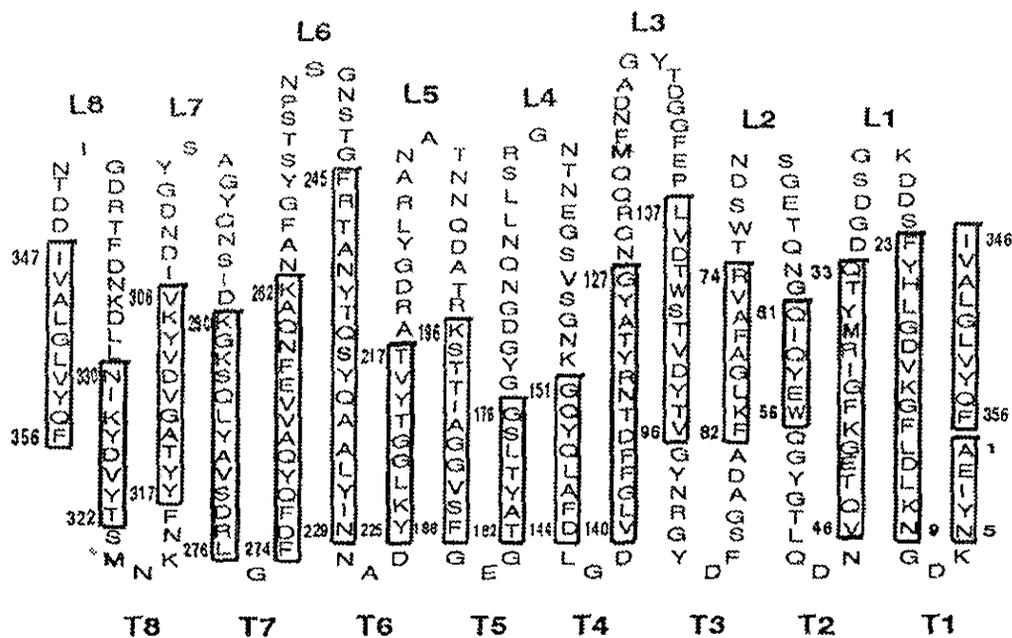


Figura 3. Modelo topológico de la porina OmpC de *Salmonella typhi*. El modelo fue desarrollado empleando varios algoritmos de predicción de estructura secundaria y por comparación con los datos cristalográficos de la porina OmpF de *E. coli*. (Martín, O., manuscrito en preparación).

2.2 TOXINA DEL CÓLERA (CT).

El cólera es causado por *Vibrio cholerae*, bacteria gram-negativa que se ingiere en los alimentos y agua contaminados. Los serotipos de *Vibrio* causantes del cólera son los biotipos 0 grupo1, El Tor y Clásico; cada uno se divide a su vez en dos serotipos: Ogawa e Inaba. Las epidemias del cólera después del año de 1961 han sido provocadas por el biotipo El Tor y, antes de ese tiempo fueron ocasionadas por el biotipo Clásico, especialmente Inaba 569B (39).

Los síntomas clínicos del cólera son producidos por una enterotoxina, la toxina del cólera (CT) (colerágeno) que es secretada por *Vibrio cholerae*. CT está constituida por dos clases de subunidades: la subunidad A (PM=27,215 Da) y la subunidad B (PM=11,677 Da) que se presentan en la molécula nativa en una proporción de 1:5 respectivamente, es decir, CT forma un complejo heterohexamérico AB₅ (PM=85,620) que consiste en 5 subunidades B idénticas (CTB) (coleragenoide) que se ensamblan en forma de pentámero (figura 4) y en el centro se localiza la subunidad A (CTA) (holotoxina). La subunidad A se compone de dos péptidos unidos por puentes disulfuro: A₁ (PM=21,817 Da) y A₂ (PM=5,398 Da); ambos se originan de un precursor común que se divide mediante una ruptura proteolítica interna que se efectúa después de la secreción extracelular de la holotoxina. CTB se une a su receptor, el gangliósido GM1 (Galb1-3GalNAcb1-(NeuAc-a2-3)-4Gal-b1-4-Glc-b1-ceramida) glucolípido presente en la membrana de las células epiteliales del intestino. Posteriormente, se efectúa la activación de la subunidad A mediante el rompimiento proteolítico

entre los residuos 192 y 194 seguida de la reducción de un puente disulfuro (cys 187=cys 199). El fragmento A₁ liberado (residuos 1-192 ó 1-194) pasa a través de la membrana donde interacciona con uno o más factores citosólicos. El fragmento A₁ se une a NAD y cataliza la ADP-ribosilación de la proteína Gsa, una preteína reguladora que se une a GTP, asociada con la adenil ciclase; y ésto produce un rápido incremento de AMP cíclico (AMPc). Como consecuencia de esto y otros factores, como el incremento de prostaglandinas por la célula intoxicada, es la activación de la bomba de sodio mediante una protein-cinasa dependiente de AMPc que provoca la acumulación de agua y sodio en el lumen intestinal y posteriormente, muerte celular. La diarrea que se presenta puede ser mayor de 6 litros por hora (39,40,41).

Ni la subunidad A ni el pentámero de la subunidad B son citotóxicos independientemente; aunque la subunidad A posee la actividad principal en el daño celular, requiere la presencia de la subunidad B para la unión con su receptor y la introducción a la célula blanco. Una vez en el citosol, la subunidad A no puede infectar a otra célula y se degrada cuando la célula muere. Los síntomas continúan debido a la producción y secreción de CT en el lumen intestinal hasta que la bacteria es erradicada de este sitio (41).

CT es codificada por genes cromosomales presentes en *V. cholera*, las cepas de biotipo clásico (cepa 569B) poseen duplicaciones cromosomales *non-tandem* del operón *ctxAB* que es estructuralmente idéntico en todas las cepas. En cambio, la mayoría del biotipo El Tor (cepa 3083), solo poseen una única copia del operón *ctxAB*; las restantes tienen 2

o más copias presentes como elementos repetidos en *tandem*. *V. cholerae* produce varios factores de virulencia además de CT, como el pili, flajelo polar y muchas hemaglutininas, que pueden funcionar como adhesinas. Elabora una proteasa (HA/proteasa) capaz de cortar y como consecuencia activa a CT y a otros factores tales como la fimbria, asociada con la virulencia. El gene *toxR* codifica para una proteína (ToxR) que controla la expresión de más de 17 genes de virulencia (incluidí *ctxAB*) (39).

La toxina del cólera pertenece a un grupo de toxinas microbianas compuestas por subunidades estructuralmente independientes: una enzimática (A) y otra de unión (B). Entre ellas tenemos a la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT), la toxina de *pertussis*, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, verotoxina-1 de *E. coli*, toxina de shiga, toxina de difteria, etc (39).

Existe gran semejanza entre la toxina del cólera y la toxina termolábil al calor de *E. coli* (LT); la homología entre sus secuencias de nucleótidos es de aproximadamente 80% (42). Por ello, la estructura cristalografica de LT (figura 4) es muy similar a CT.

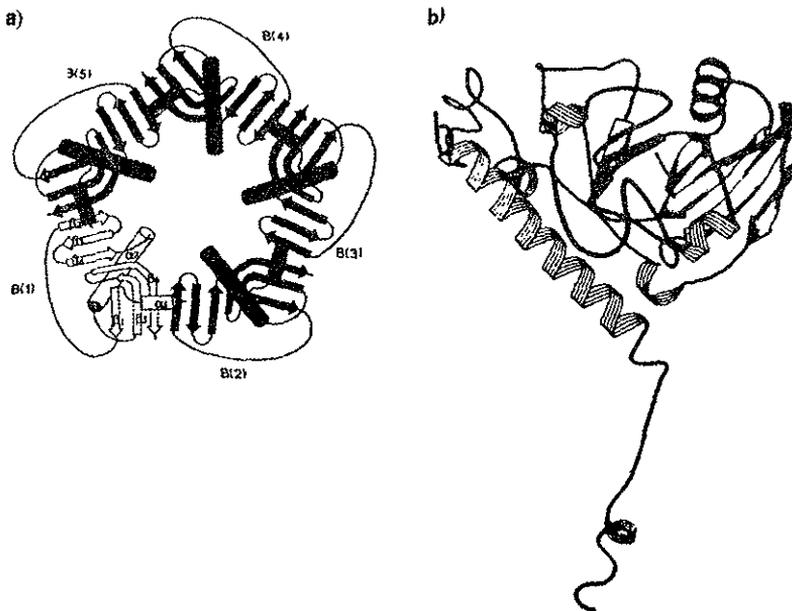


Figura 4. a) Esquema de la estructura secundaria de la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB); b) Diagrama de *ribbon* de la subunidad A que muestra la subunidad A1 y la hélice de A2 que termina con una pequeña hélice y cola (39).

2.2.1 SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DEL CÓLERA (CTB).

CTB forma un pentámero muy estable (coleragenoide) con una masa de 11,677 Da. por cada monómero; por ello la masa total del pentámero posee 58,387 Da. El poro central cilíndrico del coleragenoide (11 Å de diámetro X 40 Å de largo) se alinea mediante 5 α -hélices anfipáticas que mantienen la estabilización del pentámero. Éste posee 5 sitios de unión para GM1 con constantes de disociación de 10^{-9} - 10^{-10} M. Estudios mediante difracción de rayos-X sugieren que en ausencia del ligando, el

pentasacárido cargado negativamente de GM1 (Galb1-3GalNAcb1-(NeuAc-a2-3)-4Gal-b1-4-Glc-b1-ceramida) se sitúa a casi 21Å por arriba de la interfase lípido/agua; co-cristales de LT con lactosa (Gal-b1-4-Glc) y del coleragenoide con galactosa o con GM1 han mostrado que los sacáridos distales de GM1 se unen a una pequeña fisura adyacente a Trp88 localizada a un costado de CTB.

2.2.2 SUBUNIDAD A DE LA TOXINA DEL CÓLERA (CTA).

CTA posee un peso de 27,234 Da., y se compone de 240 amino ácidos que se rompen por la acción de una endoproteasa y forma dos cadenas: A₁ (PM=21,817 Da) y A₂ (PM=5,398 Da) antes de translocarse al interior celular. Ambas permanecen unidas mediante fuerzas no covalentes y un puente disulfuro (Cys187=Cys 199) (41).

2.2.3 INMUNOGENICIDAD DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DEL CÓLERA (CTB).

Por otra parte, también cabe destacar que CTB es un excelente inmunoadyuvante (43,44,45) en ello radica la importancia de desarrollar un sistema que permita la expresión de péptidos unidos a CTB, por esto las fusiones genéticas ofrecen una buena alternativa en la obtención de altas

cantidades de proteínas híbridas, que a su vez puedan ser empleadas como inmunógenos orales.

Cabe destacar la importancia en la vía de administración de CTB para que posea el efecto de adyuvante. Entre estos trabajos se encuentran principalmente la vía de administración oral o intranasal de antígenos y el aumento de la inmunogenicidad: se reporta la producción de IgA e IgG contra *Streptococcus* cuando la CTB fue covalentemente unida al antígeno I/II de *Streptococcus mutans* (44); altos títulos de IgG contra el virus de sarampión (MV) fueron detectados en el suero de ratones, cuando se administró intranasalmente MV y esta holotoxina como adyuvante (46); la respuesta de CTL fue más alta cuando se utilizó esta subunidad, como adyuvante, en la administración de la proteína quimérica formada por el extremo amino terminal de F₁ (polipéptido responsable de la fusión de MV a la membrana celular) y un epitopo de la nucleoproteína (NP) de MV (47); la presencia de anticuerpos se detectó con un péptido quimérico constituido por un epitopo de células T y un epitopo de células B de MV, administrados junto con CTB (48).

Sin embargo, la unión química de CTB a la proteína básica de la mielina se ha encontrado que induce tolerancia, y este modelo se emplea a nivel preventivo y de tratamiento a la encefalitis alérgica experimental (EAE) (49). También se ha encontrado un efecto similar debido a la administración de insulina (2-20 µg) conjugada químicamente a CTB que induce una supresión de la destrucción de las células β en un modelo de ratón diabético no-obeso (50).

Los trabajos anteriores se refieren exclusivamente a la conjugación química o mezcla de diferentes proteínas con CTB. Pero también es importante el desarrollo de sistemas que expresen proteínas recombinantes; por ello se señala la fusión de oligonucleótidos a *ctb* y los péptidos expresados se localizan en su extremo amino o carboxilo terminal, o en en regiones internas. Las proteínas de fusión de CTB reportadas son un decapeptido de la enterotoxina termolábil A (St_a) de *E. coli* (51); el péptido 345-359 de la glucosiltransferasa B (GtfB) de *Streptococcus mutans* (52); o el sitio activo de la misma enzima (GtfB) (53); el epitopo 120-125 de PreS₂ del virus de hepatitis B (54); un péptido de 11 aminoácidos del virus de hepatitis B de la proteína Pre-S₂ (55); el epitopo de la asa 3 variable (V3) de la proteína gp120 del virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana tipo I (VIH-1) (56); y el epitopo (296-313) de la proteína VP4 del rotavirus humano Wa. (57).

Por otra parte, también resulta atractivo expresar genes híbridos de *ctb* en una cepa de bacteria atenuada y analizar la respuesta en ratones inmunizados con la bacteria viva; tal y como lo hicieron para un dodecapeptido rico en serina fusionado en el extremo N-terminal de CTB, éste péptido se encuentra expresado en la superficie de la fase de trofozoito de *Entamoeba histolitica* y encontraron una respuesta sistémica y/o en mucosas anti-amiba y anti-*V. cholerae* (58).

En trabajos recientes, se efectuó la construcción y expresión de las proteínas híbridas que expresaron las regiones 246-255 (L6) y 290-303 (L7) de la porina OmpC de *S. typhi* en el extremo N-terminal de CTB; estos

aminoácidos correspondieron a las asas parciales 6 y 7, de acuerdo al modelo topológico propuesto para esta porina. Ambos péptidos son regiones no compartidas, es decir son *Salmonella* específicas, de acuerdo al alineamiento entre las secuencias de Omp C de *S. typhi* y *E. coli* (59,60). El vector que se utilizó para construir estas proteínas quiméricas fue el plásmido pJS752-3 (ver figura 5 en materiales y métodos), que posee el gene de la subunidad B de la toxina del cólera (*ctb*) (61,62). Este vector posee los sitios de restricción Sac I y Xma I entre la unión de la región que codifica para la secuencia líder y el gene *ctb*, por ello los oligonucleótidos con extremos compatibles a este sitio que se inserten expresarán péptidos unidos al extremo amino terminal de CTB. Sin embargo la doble digestión de los sitios SacI y XmaI es difícil de efectuarse, por ello se requieren altas cantidades de enzima (Sánchez, J., comunicación personal).

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que la doble digestión de los sitios *SacI* y *XmaI* en el vector plasmídico pJS752-3 es un poco difícil de efectuarse, así como el rápido rastreo de los genes y/o proteínas híbridas de interés. Se plantea como alternativa la de insertar un segmento de DNA para que estos sitios se separen, el fragmento de DNA a utilizar será el gene de tetraciclina (1.3 Kpb). El nuevo vector (CTBtet) presentará nuevas ventajas para la construcción de genes híbridos de interés como son: i) la separación de los sitios *SacI* y *XmaI* que facilitará la digestión de este nuevo vector, pero además se sacará de marco de lectura a *ctb*; ii) el reemplazo de cualquier oligonucleótido que codificará para algún epítipo de interés por el gene de tetraciclina; iii) el rápido y fácil rastreo de genes de fusión que expresarán epítopos unidos a CTB, mediante la pérdida de resistencia a tetraciclina (fenotipo) y/o la restitución del marco de lectura de CTB y la detección de las proteínas híbridas (ELISA-GM1); iii) este rastreo evitará la purificación y elaboración de un mapa de restricción del DNA y/o detección de las proteínas híbridas como primer paso y, únicamente se realizará esto al final para caracterizar las construcciones obtenidas.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se pretende obtener las construcciones de las asas (regiones externas) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de *OmpC* de *S. typhi* fusionadas al gene *ctb*. Para ello primero se debe de construir un vector que facilite la fusión genética de fácil rastreo y caracterización de las proteínas híbridas generadas.

IV OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- ♦ Diseño y construcción de un vector para la fusión genética de genes híbridos de interés y fácil ratreo de las proteínas de fusión.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- ♦ Mutagenizar el gene de tetraciclina, para que adquiriera los extremos Sac I (5') y Xma I (3').
- ♦ Subclonar el gene de tetraciclina en el plásmido pJS752-3.
- ♦ Obtener los genes de fusión de las asas 1,2,3,4,5,6,7 y 8 de *ompc* de *Salmonella typhi* unidos al gene *ctb*.
- ♦ Determinar la expresión de las proteínas híbridas de las asas 1,2,3,4,5,6,7 y 8 de OmpC :: CTB.

V MATERIALES Y MÉTODOS.

BACTERIAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Escherichia coli DH10B fue utilizada como célula electrocompetente, se guardó a -70°C en 30% de glicerol. Las bacterias se crecieron en medio Luria-Bertani (1.0% cloruro de sodio, 1.0% de bacto-triptona y 0.5% de extracto de levadura, $\text{pH}=7.0$) a 37°C y 200 rpm. Cuando fue necesario se agregó ampicilina (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tetraciclina (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

PLÁSMIDO.

Se posee el vector plasmídico pJS752-3 (figura 5), derivado del pKK223-3, a su vez derivado del pBR322, el cual contiene el gene de la subunidad B de la toxina del cólera (*ctb*), que se expresa en forma constitutiva, y está unido a la secuencia del péptido líder de la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (*ltb*); este gene híbrido está bajo el control del promotor *lac* (17,18). El vector pJS752-3 utiliza el origen de replicación del plásmido pBR322 y posee varios sitios de corte para endonucleasas de restricción que pueden emplearse para el diseño y construcción de genes híbridos de interés; por ejemplo, contiene los sitios de restricción *Sac* I y *Xma* I en la unión entre la región que codifica para la secuencia líder y *ctb*. Por ello todos aquellos oligonucleótidos con extremos cohesivos *Sac*I y

Xma I que se inserten en esta región se expresan como péptidos unidos al extremo amino terminal de CTB.

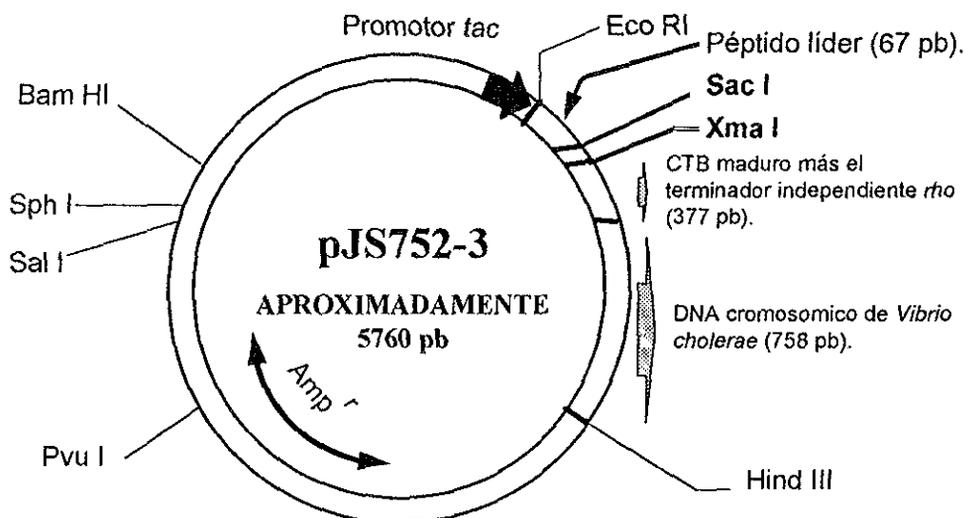


Figura 5.- Mapa del vector plasmídico pJS752-3. La proteína CTB está codificada por el gen *ctb* y éste se encuentra fuertemente regulado por el promotor *tac*. Se muestran los sitios de corte para endonucleasas de restricción y la resistencia a ampicilina.

También se empleó el plásmido pBR322 (figura 6) que ya ha sido previamente descrito (63) para amplificar la secuencia de tetraciclina. Estos plásmidos se guardaron a -20°C .

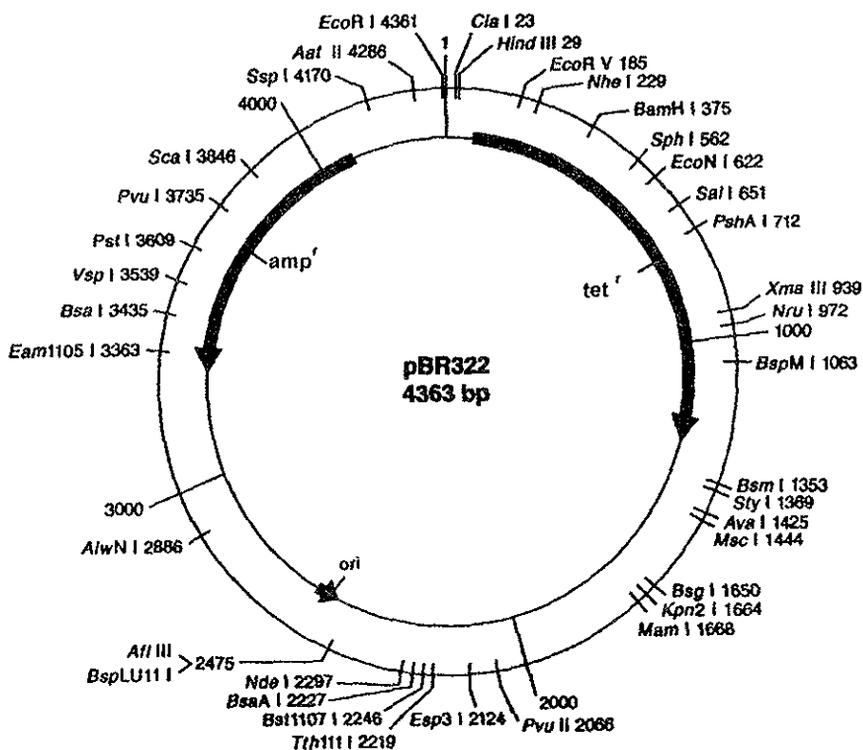


Figura 6. Mapa del plásmido pBR322.

OLIGONUCLEÓTIDOS.

Se sintetizaron los oligonucleótidos de cadena sencilla para la amplificación del gene de tetraciclina a National Biosciences, Inc. (NBI). Además de los oligonucleótidos complementarios de cadena sencilla que correspondieron a las regiones expuestas de *OmpC* de *S. typhi*: asa 1 SDDKGS DGD (aminoácidos 24-32), asa 2 GNQTEGSNDSWT (aminoácidos 62-73), asa 3 PEFGGDTYGADNFMQQRGN (aminoácidos 108-126), asa 4

KNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYG (aminoácidos 152-175), asa 5
RTADQNNTANARLYGDRA (aminoácidos 197-216), asa 6
GTSNGSNPSTSYGFAN (aminoácidos 246-261), asa 7 DISNGYGASYGDNI
(aminoácidos 291-305) y asa 8 LLDKNDFTRDGINRDD (aminoácidos 331-
346). Estos oligonucleótidos fueron diseñados para generar extremos
cohesivos con terminación 5'-Sacl (AGCTC o AGCT) y 3'-XmaI (CCCGG) al
ser apareados y se emplearon codones que son utilizados preferentemente
en *E. coli* (64).

MUTAGENESIS DEL GENE DE TETRACICLINA.

Se amplificó el gene de tetraciclina mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó como DNA templado el plásmido pBR322 (4363 pb) para la amplificación del gene de tetraciclina, los iniciadores a emplear fueron los siguientes: iniciadores en río arriba 5'GCGCGGAGCTCATGTTTGACAGC 3'; iniciadores en río abajo 5'GCGAGGTGCCCGCCGGGCTTCC 3'. La reacción consistió en lo siguiente: Taq DNA polimerasa, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP'S, 1 mg de cada uno de los iniciadores. El primer ciclo consistió en desnaturalizar el templado a 94°C, alineamiento a 55°C y expansión a 72°C, todas estas temperaturas se efectuaron durante 5 minutos; esto fue seguido de 34 ciclos con las mismas temperaturas que las condiciones anteriores, pero con una duración en cada una de ellas de 1 minuto; finalmente el último ciclo se efectuó a 72°C durante 10 minutos.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

La purificación de la banda de DNA, a partir de geles de agarosa, correspondiente al gene *tet* se efectuó mediante el kit US Bioclean (United States Biochemical), como se describe brevemente a continuación: se cortó la banda de DNA del gel de agarosa, y se mezcló con 3 volúmenes de NaI 6 M, se incubó a 55°C durante 3-5 minutos. Posteriormente se le agregó una solución que contenía microesferas de vidrio, aproximadamente 5 μ l, se mezcló y se incubó durante 5 min. en hielo; al cabo de este tiempo se centrifugó a 3,000 x g / 1 minuto. Se decantó y se recuperaron las microesferas, a éstas se les agregó una solución que contenía etanol 50%, Tris-HCl 0.2 M pH=7.5, NaCl 1.0 M y EDTA 20 mM, se mezcló suavemente y se centrifugó a 3,000 x g / 1 min. Se decantó y a las microesferas se les agregó 10 μ l de H₂O y se incubó a 55°C durante 2-5 minutos. Se centrifugó a 3,000 x g / 3 min, y se recuperó el sobrenadante que contenía el DNA.

CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pCTBtet (*amp*^r, *tet*^r).

El gene de tetraciclina (aproximadamente 1,299 pb) (*tet*) con extremos cohesivos *Sac*I y *Xma*I, fue subclonado en el plásmido pJS752-3: El vector resultante pCTBtet adquirió el marcador de resistencia a tetraciclina (*tet*^r), además del que ya posee (*amp*^r), también se sacó de fase a *ctb*.

FUSIÓN GENÉTICA.

Oligonucleótidos complementarios de cadena sencilla que correspondieron a las asas 1,2,3,4,5,6,7 y 8 se alinearon alineados en igual concentración molar a 65°C y enfriados a temperatura ambiente.

El plásmido pCTBtet (amp^r , tet^r), derivado del pJS752-3, fue tratado con las endonucleasas SmaI y XmaI, y se efectuó la ligación con los oligonucleótidos apareados utilizando T4 ligasa durante 12 hrs. a 16 °C.

ELECTROPORACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO.

La captación de los diferentes plásmidos por las bacterias, fue realizada en un equipo de electroporación (BRL Life Technologies, Inc.) aproximadamente a 2.42 kV.

La purificación del DNA plasmídico fue efectuado mediante el kit Wizard (Wizard Plus Minipreps DNA Purification System-Promega), el cual se describe a continuación. Se inoculó una colonia de bacterias en 1-3 ml de medio LB, y se dejó en crecimiento durante 18 horas; se centrifugó a 10,000 x g por 1-2 minutos, se decantó y se resuspendió la pastilla en 200 μ l de solución de resuspensión de células; después se adicionó 200 μ l de solución de lisis y por último se le agregó 200 μ l de solución de neutralización. Se centrifugó el lisado a 10,000 x g durante 5 minutos; se recuperó el sobrenadante que se mezcló con 1 ml de resina, se paso esta

mezcla a través de una columna y a continuación se lavó con 2 ml de solución de lavado de la columna. Se centrifugó a 10,000 x g durante 2 minutos, con el objeto de secar la columna y finalmente se le agregó a la columna 50 µl de H₂O precalentada a 70-75°C; se centrifugó a 10,000 x g durante 20 segundos para eluir y recuperar el DNA.

MAPEO DE REESTRICCIÓN.

Las enzimas Sac I y Xma I fueron de la marca New England Biolabs, T4 ligasa de Promega y Gibco y las demás que se emplearon en la elaboración del mapa de restricción (BamHI, SmaI) correspondieron a Boehringer Mannheim.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Se procedió a la caracterización de las muestras del DNA plasmídico mediante el análisis electroforético en geles de agarosa al 1.0% y 3.0%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se efectuaron los corrimientos en un sistema de Tris-Boratos-EDTA (89 mM tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM Na₂ EDTA.2H₂O).

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SÓLIDA (ELISA-GM1).

Para determinar la presencia de las proteínas híbridas en el sobrenadante de cultivo de la bacteria recombinante, se empleo el método de GM1-ELISA, como se describe brevemente (65): se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos, con 100 μ l/pozo de una solución 1.5 mM del gangliósido GM1 (Sigma, Co.), en PBS (NaH_2PO_4 1.9 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, NaCl 154 mM, pH=7.2); se incubó a 37°C durante 1.5 hrs. Las placas se lavaron con PBS tres veces; posteriormente se bloqueo con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, Co.) al 0.1% en PBS utilizando 200 μ l/pozo e incubando a 37°C durante 1 hr. Al terminar la incubación se lavaron 3 veces con PBS y otras 3 ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T). Posteriormente se agregó 100 μ l/pozo de los sobrenadantes de cultivo de las bacterias, y se incubó a 37°C durante 2 hrs., al cabo de este tiempo se lavaron 3 veces con PBS y otras 3 con PBS-T. Después se agregó el anticuerpo monoclonal LT39, que reconoce a la subunidad B de la toxina del cólera en su forma pentamérica, en una dilución 1:50 en PBS-BSA al 0.1%; se incubó a 4°C durante toda la noche; se lavó 3 veces con PBS y otras 3 con PBS-T. A continuación se agregó el conjugado anti-IgG de ratón en una dilución 1:1000 y se incubó 1 hr a temperatura ambiente; una vez transcurrido este tiempo se lavó 3 veces con PBS y otras 3 con PBS-T. Finalmente se agregó el sustrato (o-fenilen-diamina 1,2- benzanodiamina 1 mg/ml, buffer de citratos 0.1 M pH=4.5, H_2O_2 al 30%), se dejó desarrollar el color durante aproximadamente 10 minutos, se detuvo la reacción con

VI RESULTADOS.

MUTAGENIZACION DEL GENE TETRACICLINA (*tet*).

Se amplificó el gene de tetraciclina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como template de DNA el plásmido pBR322; los iniciadores se diseñaron para amplificar la secuencia de tetraciclina (incluyendo a su propio promotor) y que se generan los sitios de reconocimiento para las endonucleasas Sac I y Xma I, en los extremos 5' y 3' respectivamente. Se obtuvieron dos productos (figura 7), uno correspondiente a la secuencia de tetraciclina con aproximadamente 1300 pb y otro con 500 pb; como el producto de interés fue el correspondiente a 1.3 Kpb se procedió a la purificación de este producto para posteriormente subclonarlo en el plásmido pJS752-3.

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pCTBtet (*amp*^r, *tet*^r).

Se construyó un nuevo vector, que consistió en subclonar en el plásmido pJS752-3 el gene de tetraciclina con extremos cohesivos 5'-SacI y 3'-XmaI, entre la región que codifica para la secuencia líder de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (*ltb*) y el gene de la subunidad B de la toxina del cólera (*ctb*). El nuevo vector, que se denominó pCTBtet, adquirió resistencia a tetraciclina (*tet*) además del marcador que ya poseía (*amp*^r), y presentó aproximadamente 7060 pb (figura 8, carril 1) cuando fue

linealizado mediante la digestión con la endonucleasa *SacI*. Por otra parte se trató este vector con las enzimas de restricción *SacI* y *XmaI* (figura 8, carril 2) y generó la banda correspondiente al gene *tet* (1300 pb).

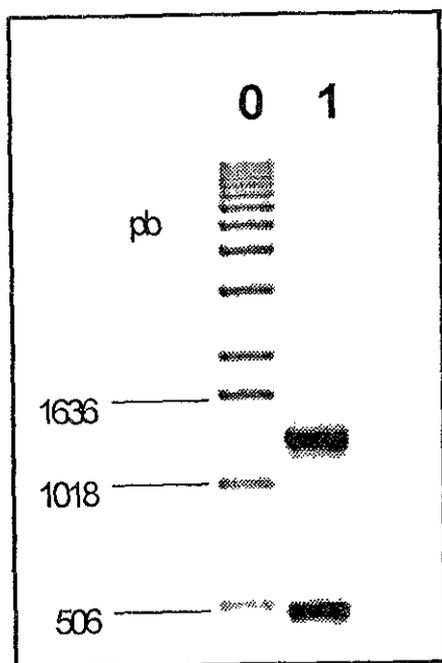


Figura 7. 0)Estandares de pares de bases de 1Kpb; 1) Productos de la amplificación mediante PCR.

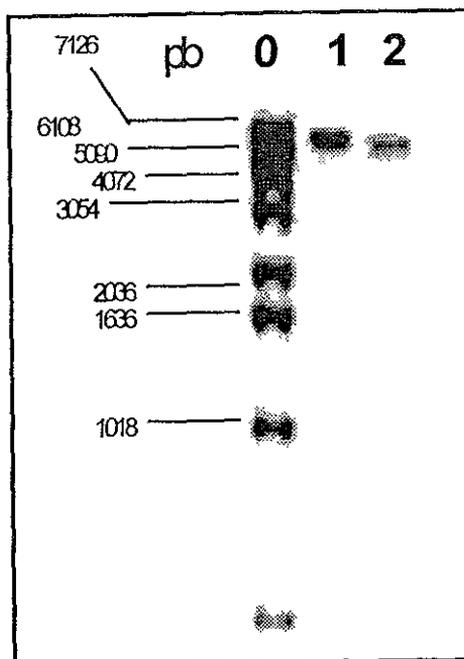


Figura 8. Mapa de restricción del vector pCTBtet. 0)Estándares de pares de bases de 1Kpb; 1)Digestión con *SacI*; 2)Digestión con *SacI* y *XmaI*

El mapa del vector plasmídico se señala en la figura 9, donde se muestra el gene de tetraciclina que se insertó, indicando alguno de los sitios de corte para las endonucleasas de restricción.

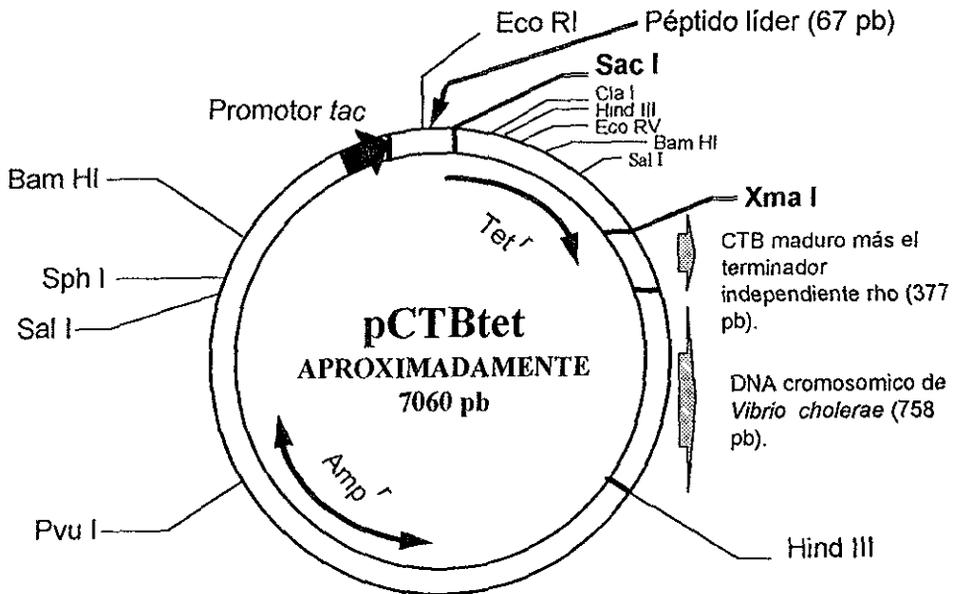


Figura 9. Mapa del plásmido pCTBtet (*amp^r*, *tet^r*), contiene el gene de resistencia a tetraciclina entre la unión de la secuencia líder y el gene *ctb*, por ello esta fuera el marco de lectura de *ctb*. Presenta resistencia a ampicilina y tetraciclina.

CONSTRUCCIÓN DE LOS GENES HÍBRIDOS DE LAS ASAS DE *ompc :: ctb* .

Se construyeron los genes híbridos que codificaban para cada una de las 8 regiones externas (asas) de la porina Omp C de *S. typhi* que se expresaron en el extremo N-terminal de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB). Los vectores obtenidos se denominaron: pCTB-L1 (asa 1 *ompc::ctb*), pCTB-L2 (asa 2 *ompc::ctb*), pCTB-L3 (asa 3 *ompc::ctb*), pCTB-L4 (asa 4 *ompc::ctb*), pCTB-L5 (asa 5 *ompc::ctb*), pCTB-L6 (asa 6 *ompc::ctb*), pCTB-L7 (asa 7 *ompc::ctb*) y pCTB-L8 (asa 8 *ompc::ctb*).

En la figura 10 se muestran las 8 construcciones antes descritas, se determinaron la presencia de los insertos mediante la digestión con las endonucleasas de restricción BamHI y SmaI (isoesquimero de XmaI) . En los carriles 1-8 se señalan estas construcciones y como poseen diferentes insertos de las regiones externas de *ompc*, el patrón de migración se retardo con respecto al vector pJS752-3 (carril 0) y se observa que la asa 4 es la más grande y, la asa 1 es la menor. La inserción de estos oligonucleótidos entre los sitios SacI y XmaI del plásmido pCTBtet permitió el intercambio de la secuencia de tetraciclina por cada uno de estos nucleótidos permitiendo una fácil selección de las clonas positivas con unicamente rastrear la colonias tetraciclina sensibles. La expresión de las proteínas híbridas estuvieron bajo el control del promotor *tac* expresándose en forma constitutiva, y consistieron del péptido líder de la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de *E. coli* , cada una de las asas de *ompc* y, la región de la proteína madura de CTB. Existen en estas proteínas híbridas

precursoras dos sitios potenciales de procesamiento que corresponden a los sitios originales, tanto del péptido líder de LTB (ala 22) como de CTB (tir 25); siendo éste último el sitio de procesamiento utilizado en la proteína LTB-CTB en ausencia de las asas de la porina (61,62). Al insertarse las asas de Omp C, la tirosina 25 es desplazada dependiendo del tamaño del péptido que se inserte, aumentándose así la probabilidad de que el péptido líder sea procesado en la ala 22, de tal forma que quedan intactas las regiones externas de esta porina. Esto último ya fue comprobado mediante la expresión de un péptido de rotavirus y un decapeptido de la enterotoxina estable al calor de *E. coli* (51,57).

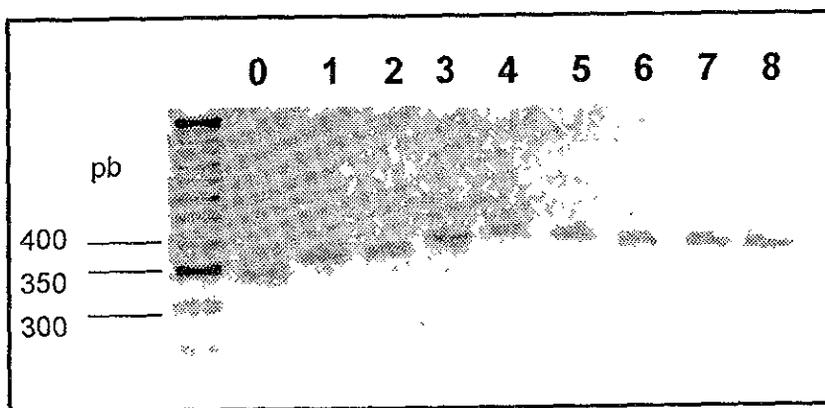


Figura 10. Mapa de restricción de los genes de fusión de las asas 1,2,3,4,5,6,7 y 8. Las construcciones se denominaron pCTB-L1 (asa 1 *ompc::ctb*), pCTB-L2 (asa 2 *ompc::ctb*), pCTB-L3 (asa 3 *ompc::ctb*), pCTB-L4 (asa 4 *ompc::ctb*), pCTB-L5 (asa 5 *ompc::ctb*), pCTB-L6 (asa 6 *ompc::ctb*), pCTB-L7 (asa 7 *ompc::ctb*) y pCTB-L8 (asa 8 *ompc::ctb*).

Finalmente la detección de CTB_r, en las cepas transformadas con el vector pCTBtet, se analizó en los sobrenadantes de cultivo, mediante la técnica de ELISA-GM1, empleando el anticuerpo monoclonal LT39 que únicamente reconoce la forma pentamérica de CTB. Los resultados se muestran en la tabla 3, donde se observa que la proteína CTB_r esta fuera del marco de lectura. En esta misma tabla se presentan las concentraciones de las 8 proteínas híbridas que corresponden a las diferentes asas::CTB. La cantidad de proteína que se detectaron, interpolando las concentraciones con respecto a una concentración de CTB comercial fue de aproximadamente 160-270 ng/ml.

VECTOR ^a	ng CTB /1.0 D.O. ^b
pCTB-L1	202.9
pCTB-L2	240.9
pCTB-L3	250.1
pCTB-L4	198.9
pCTB-L5	273.3
pCTB-L6	162.7
pCTB-L7	196.7
pCTB-L8	179.2
pJS752-3	55.3
pCTBtet	0.000

Tabla 3. Detección de las proteínas híbridas mediante el empleo del anticuerpo LT39 anti-ctb (n=2). ^aLa nomenclatura empleada es la siguiente: CTB indica que es el gene *ctb*, L y el número señala el asa (*loop*) a la que pertenece. ^bEl crecimiento se determinó considerando 1.0 D.O. en 1.0 ml de sobrenadante de cultivo.

VII DISCUSIONES.

En este trabajo se efectuó la construcción de un nuevo vector, designado pCTBtet, derivado del pJS752-3, que presentó varias ventajas con respecto al plásmido original, entre ellas: i) la rápida construcción de genes híbridos, debido a que los sitios *SacI* y *XmaI* se separaron, mediante la inserción del gene *tet*, además se sacó del marco de lectura a *ctb*; ii) fácil rastreo en el fenotipo de las clonas que contenían los genes químericos, debido a que se seleccionaron las colonias *tet*^s, esto fue porque existió un intercambio del gene *tet* por los oligonucleótidos que codificaban para los péptidos de interés; iii) el rastreo inmunoenzimático (ELISA-GM1) de las proteínas híbridas, debido a que se restauró el marco de lectura de *ctb*, que permitió seleccionar las clonas CTB positivas y, éstas como posibles candidatas a contener las construcciones; iiiii) los dos puntos anteriores implicaron grandes ventajas porque se evitó la purificación de DNA plasmídico y/o sobrenadantes de cultivo de muchas clonas que fueron posibles candidatas para contener los genes híbridos de interés; iiiiii) como último paso se caracterizaron las construcciones mediante la elaboración de un mapa de restricción y cuantificación de las proteínas híbridas secretadas.

Se construyeron genes híbridos que codificaron para las 8 asas de *OmpC* de *S. typhi*, estos péptidos se expresaron en el extremo N-terminal de la subunidad B de la toxina del cólera. Prácticamente todas las clonas que resultaron ser *tet*^s y, posteriormente mediante ELISA-GM1 se confirmó que CTB estuviese nuevamente en fase. Se caracterizaron los insertos

(mediante la elaboración de un mapa de restricción) que correspondieron a las asas de *Omp C*.

No obstante, siguiendo esta misma estrategia se construyeron 5 genes híbridos, empleando el vector pCTBtet y, se encontró que aproximadamente el 80% de las clonas que resultaron ser tet^s expresaron los insertos correctos. Estos correspondieron a péptidos con 7-22 aminoácidos del factor de colonización CFAI de *E. coli* (Sánchez, J., Holmgren, J. y Svennerholm, A.M. manuscrito en preparación)

Estos genes quiméricos (*asas::ctf*) se expresaron bajo el control del promotor *tac*, con la señal líder de LTB lo que provoca que las proteínas híbridas sean secretadas al medio de cultivo. Los niveles que se obtuvieron fueron de aproximadamente 160-270 ng/ml en los sobrenadante de cultivo. Esto último se confirmó mediante lo previamente reportado en *E. coli* (1-5 µg/ml) (Sánchez, J. comunicación personal). Además el hecho de que las proteínas quiméricas puedan ser detectadas en los sobrenadantes comprueba lo previamente señalado, donde el péptido líder de LTB se procesa posiblemente en su sitio de procesamiento original (ala 22), ya que el otro sitio de procesamiento (tir 25) es desplazado mediante la inserción de los oligonucleótidos de interés (61,62).

Por otra parte, se poseen datos preliminares de que la mayor cantidad de las proteínas de fusión no son secretadas y se retiene la mayoría en el espacio periplásmico de *E. coli*, aproximadamente 5-10 veces más con respecto al sobrenadante. Sin embargo, si se detecta la presencia de las

proteínas quiméricas en los sobrenadantes de cultivo. Si se expresarán estas construcciones en *Vibrio cholerae* cepa pJS1569, las proteínas híbridas aumentarían por un factor de 10 y, a menudo mayor, es decir, 10-50 mg/ml o mayor. En cambio, las pastillas celulares en *Vibrio* tienen menos de 1 µg/ml de proteína recombinante (Sánchez, J., comunicación personal) .

La expresión de los péptidos en el extremo N-terminal de CTB no altero la conformación estructural de esta proteína debido a que las proteínas híbridas reconocieron al receptor de CTB, el gangliosido GM1 (mediante la técnica de GM1-ELISA) y además se utilizó un anticuerpo monoclonal (LT39) que únicamente reconoce la forma pentamérica de CTB. Esto es apoyado por los resultados del sitio de unión de CTB con GM1 es la región cercana al triptofano 88 (estructura cristalografica de CTB), por ello no existe impedimento alostérico para que los anticuerpos puedan reconocer a las asas de OmpC fusionados a CTB (59,60).

Una de las metas del proyecto a futuro es contribuir a la caracterización del modelo topológico propuesto para Omp C, mediante el mapeo de epitopos, que permitirán establecer si determinados segmentos se encuentran en regiones transmembranales o en regiones expuestas al medio externo. Parte de este modelo topológico ya fue apoyado con datos experimentales donde se expresaron los segmentos 246-255 y 290-303, que corresponderían a las asas 6 y 7 parciales, de OmpC de *S. typhi* en el extremo N-terminal de CTB (59) y, mediante la obtención de anticuerpos monoclonales contra ambas regiones se encontró que estos anticuerpos reconocen a la bacteria intacta (60), lo que comprueba que las regiones

propuestas como segmentos extracelulares se exponen hacia el exterior de *S. typhi*.

Existe otro modelo topológico propuesto para OmpC de *S. typhi*, éste es muy similar porque también se compone de segmentos extracelulares, una parte transmembranal y segmentos intracelulares; sin embargo, no ha sido apoyado con datos experimentales (66). Entre otros modelos topológicos propuestos se encuentra un modelo de las porinas del género *Neisseria*; éste se basa en la existencia de regiones altamente conservadas y capaces de formar hojas- β anfipáticas localizadas en la membrana, y regiones altamente variables, con predominancia de aminoácidos hidrofílicos (que se proponen como expuestos en la superficie (67).

Con respecto a otros modelos topológicos para porinas, encontramos al modelo propuesto para la porina tipo b (Hib), también denominada P2, de *Haemophilus influenzae* que posee una masa molecular de 38kDa y 341 aminoácidos, constituye aproximadamente el 50% del total de proteína de la membrana externa; éste tiene una estructura muy semejante para OmpC, está constituido por 16 segmentos transmembranales, 8 asas extracelulares largas y 8 asas intracelulares cortas (68); el reconocimiento de epitopes por anticuerpos monoclonales proporcionan evidencias de la orientación de determinadas regiones de esta porina, entre ellas la asa extracelular 5 (69).

Sin embargo, resulta interesante comparar un modelo topológico propuesto con la estructura cristalográfica reportada para la misma proteína; esto ocurrió con LamB de *E. coli* que es una maltoporina que permite el

paso de maltosa, lo que se encontró fue que las regiones basadas en predicciones de estructura secundaria no correspondían en su mayoría con las halladas en el modelo basado en la cristalografía por difracción de rayos X; ésto sugiere que los modelos propuestos deben de comprobarse mediante otros métodos existentes (como son el mapeo de epitopos mediante anticuerpos y/o la cristalografía de la proteína (70).

Como perspectiva se propone la evaluación de la respuesta inmune empleando las proteínas híbridas OmpC::CTB mediante la inmunización oral y/o intranasal. Se espera que se genere respuesta inmune principalmente en mucosas, y también respuesta sistémica. Debido a que CT como CTB no son únicamente fuertes inmunógenos en mucosas, sino también excelentes adyuvantes (43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53). Las administraciones principalmente por vía oral o intranasal ha aumentado la inmunogenicidad de antígenos cuando se emplea CTB como adyuvante. Sin embargo, todavía no se conoce muy bien porque es un buen adyuvante. Se propone que el aumento de la inmunogenicidad se debe en parte, porque CT incrementa la permeabilidad de las membranas mucosas del intestino hacia antígenos (71), existe un aumento de las células presentadoras de antígeno (expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II y producción de interleucina-1) (72), cambio de isotipo de IgM a IgG e IgA en los linfocitos B presentes en las placas de peyer (PP) (73).

VIII CONCLUSIONES.

- ♦ Se construyó un vector que facilitó la fusión genética y el rápido rastreo de péptidos en el extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina del cólera.
- ♦ Se construyeron 8 genes híbridos que expresaron péptidos de 9-24 aminoácidos, que correspondieron a las regiones expuestas de OmpC, en el extremo N-terminal de la subunidad B de la toxina del cólera.
- ♦ No se alteró la conformación estructural de las proteínas de fusión OmpC::CTB.
- ♦ Este vector (pCTBtet) se puede emplear para la expresión de cualquier otro péptido de interés biológico.

IX BIBLIOGRAFIA.

1. Jap, B. K. y Walian, P.J. 1996 .Structure and functional mechanism of porins. *Physiol. Review.* 76(4): 1073-1088.
2. Osborn, M.J. y Wu, H.C.P. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:369-422.
3. Nikaido, H. y Vaara, M. 1987. Outer membrane. En "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Celular and Molecular biology*" (Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schrechter, M. y Umbarger, H.E. Eds). Vol 1. American Society for Microbiology. pp 7-22.
4. Cowan, S.W. y Rosenbush, J.P. 1994. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* 264:914-916.
5. Nikaido, H. y Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
6. Schulz. G.E. 1993. Bacterial porins: Structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 701-707.
7. Nikaido, H. 1994 .Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 269 (6): 3905-3908.
8. Cowan, S.W. y Rosenbush, J.P. 1994 .Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* 264: 914-916.
9. John, P. y Whatley, F.R. 1975. *Nature* 254:495-498.
- John, P. y Whatley, F.R. 1977. *Adv. Bot. Res.* 4:51-115.
10. Manella, C.A.1992. *Trends Biochem. Sci.* 17:315-320.
11. Nakae, T. 1976. identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 71:877-884.
12. Garavito, R.M. y Rosenbush, J.P. 1980. Three-dimensional crystals of an integral membrane protein: an initial X-ray analysis. *J. Cell Biol.* 86: 327-329.
13. Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A. Jansonius, J.N. y Rosenbush, J.P. 1992 .Crystal structure explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358:727-733.
14. Weiss, M.S., Ubele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E. y Schulz, G.E. 1991 . Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254: 1627-1630.

15. Bosch, D., Scholten, M., Verhagen, C. y Tommassen, J. 1989. The role of the carboxy-terminal membrane-spanning fragment in the biogenesis of *Escherichia coli* K12 outer membrane protein PhoE. *Mol. Gen. Genet.* 16: 144-148.
16. Struyvé, M., Moons, M. y Tommassen, J. 1991. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* 218:141-148.
17. Hirsh, A., Breed, J., Saxena, K., Richter, O.M., Ludwig, B., Diederichs, K. y Welte, W. 1997. The structure of porin from *Paracoccus denitrificans* at 3.1 Å resolution. *FEBS Lett* 404(2-3): 208-210.
18. Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A. y Calva, E. 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity: dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5: 1205-1210.
19. Puente, J.L., Alvarez-Scherer, V., Gosset, G. y Calva, E. 1989. Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and the *Escherichia coli* ompC genes. *Gen* 83: 197-206.
20. Venegas, A., Gómez, I. Zavor, I y Yudelevich, A. 1988. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene. *Nucleic. Acid. Res.* 16:7721
21. Singh, S.P., Singh, S.R., Williams, Y.U., Jones, L. y Abdullah, T. 1995. Antigenic determinants of the OmpC porin from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 63(12): 4600-4605.
22. Jeanteur, D. , Lakey, J.H. y Pattus, F. 1991. The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* 5(9): 2153-2164.
23. Singh, S.P., Upshaw, Y., Abdullah, T., Singh, S.R. y Klebba, P.E. 1992. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD y OmpC. *J. Bacteriol.* 174(6): 1965-1973.
24. Klebba, P.E., Benson, S.A., Bala, S., Abdullah, T., Reid, J., Singh, S.P. y Nikaido, H. 1990. Determinants of OmpF porin antigenicity and structure. *J. Biol. Chem.* 265(12):6800-6810.
25. Smith, N.H. Smith, J.M. y Spratt, B.G. 1995. Sequence evolution of the *porB* gene. of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: evidence of positive Darwinian selection. *Mol. Biol. Evol.* 12(3): 363-370.
26. Contreras, I., Muñoz, L., Toro, C. y Mora, G. 1995. Heterologous expression of *Escherichia coli* porin genes in *Salmonella typhi* Ty2:

- regulation by medium osmolarity, temperature and oxygen availability. FEMS Microbiol. Lett. 133: 105-111.
27. Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A. y Calva, E. 1991 .Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. Mol. Microbiol. 5(5): 1205-1210.
28. Huang, K.J., Lan, C-L. e Igo M.M. 1997. Phosphorylation stimulates the cooperative DNA-binding properties of the transcriptional factor OmpR. Proc. Natl. Acad. sci. USA 94: 2828-2832.
29. Jin, T. e Inouye, M. 1995 .Identification of the genes in multicopy plasmids affecting *ompC* and *ompF* expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 133: 225-231.
30. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Vargas, M., González, C., Paniagua, J., Moreno, J. y Kumate, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection after immunization with outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. Infect. Immun. 52: 2953-2959.
31. Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., García, J. y Kumate, J. 1992 . Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain specific porins. Vaccine 10:811-813.
32. González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., García, J., Blanco, F. y Kumate, J. 1993 . Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isilated from *Salmonella*. Microbiol. Immunol. 37: 793-799.
33. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Moreno, J., Paniagua, J., Vargas, M., González, C., y Kumate, J. 1988. The role of outer membrane proteins from gram-negative bacteria as vaccines with special emphasis in typhoid fever: monoclonal antibodies against *S. typhi* porins. En "Cell function and disease". (Cañedo,L.E., Todd,L.E., Packer, L. y Jaz, J. Eds). Plenum Press. N.Y. 281-292 pp.
34. Paniagua-Solís,J., Isibasi, A., Pelayo, R., Ortiz-Navarrete, V., Muy, M., González, C., García, J.A., Islas, S. y Kumate, J. 1989. Anticuerpos monoclonales anti-lipopolisacárido de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d :análisis de protección pasiva en un modelo murino de fiebre tifoidea. Arch. Invest. Med. (Mex) 20: 315-320.
35. Ortiz, V., Isibasi, A., García, O.E. y Kumate, J. 1989 . Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. J. Clin. Microbiol. 27: 1640-1645.

36. Blanco, F., Isibasi, A., González, C., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C. y Kumate, J. 1993. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scan. J. Infect. Dis.* 25:73-80.
37. Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M.P., Martín, N., Ramírez, G., González, C., López, C., Sánchez, J., Kumate, J. y Ortiz, V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Ac. Sci.* 730: 350-352.
38. Hopp, T.P. y Woods, K.R. 1981. Prediction of proteins antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 (6): 3824-3828.
39. Spangler, B.D. 1992. Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microb. Review.* 56(4): 622-647.
40. Mekalanos, J.J. 1988. Production and purification of cholera toxin. *Methods in Enzymology.* Vol 165. 169-175.
41. Zhang, R.-G., Scott, D.L., Westbrook, M.L., Nance, S., Spangler, B.D., Shipley, G.G. y Westbrook, E.M. 1995. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* 251: 563-573.
42. Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., Wartna, E.S., van Zanten, B.A.M., Witholt, B. y Hol, W.G.J. 1991. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351:371-377.
43. Elson, C.O. 1987. Cholera toxin as a mucosal adjuvant -the effect of H-2 genes- *Fed. Proc.* 46, 1778.
44. Czerkinsky, C., Russell, M.W., Lycke, N., Lindblad, M y Holmgren, J. 1989. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* 57: 1072-1077.
45. Holmgren, J. y Czerkinsky, C. 1992. Cholera as a model for research on mucosal immunity and development of oral vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 387-391.
46. Muller, C.P., Beauverger, P., Schneider, F., Jung, G. y Brons, N.H.C. 1995. Cholera toxin B stimulates systemic neutralizing antibodies after intranasal co-immunization with measles virus. *J. Gen. Virol.* 76: 1371-1380.
47. Partidos, C. D., Vohra, P. y Steward, M.W. 1996. Priming of measles virus-specific CTL responses after immunization with CTL epitope linked to a fusogenic peptide.
48. Hathaway, L.J., Partidos, C.D., Vohra, P. y Steward, M.W. Induction of systemic immune responses to measles virus synthetic peptides administered intranasally. *Vaccine.* 13(10): 1495-1500

49. Sun, J-B., Rask, C., Olsson, T., Holmgren, J. y Czerkinsky, C. 1996 . Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. 93:7196-7201.
50. Bergerot, Y., Ploix, C., Petersen, J., Moulin, V., Rask, C., Fabien, N., Lindblad, M., Mayer, A., Czerkinsky, C., Holmgren, J. y Thivolet, C. 1997 . A cholera toxin-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 4610-4614.
51. Sanchez, J., Svennerholm, A.M. y Holmgren, J. 1988 .Genetic fusion of a non-toxic heat-stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B subunit. FEBS LETT. 241(1,2): 110-114.
52. Detzbaugh, M.T. Peterson, D.L. y Macrina, F.L. 1990 .Cholera toxin B subunit gene fusion: Structural and functional analysis of the chimeric protein
53. Laloi, P., Munro, C.L. Jones, K.R. y Macrina, F.L. 1996 .Immunologic characteristics of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase B sucrose-binding site peptide-cholera toxin B subunit chimeric protein. Infect. Immun. 64(1): 28-36.
54. Cheng-hua, S., Cheng, C., Jing-shen, Z., Jiezhi, Li. y Quing-jun, M. 1995 .Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV PreS2 epitope and the antigenicity of fusion protein. Vaccine, 13(10): 933-937.
55. Bäckström M., Holmgren, J., Schödel, F. y Lebens, M. 1995 .Characterization of an internal permissive site in the cholera toxin B subunit and insertion of epitopes from human immunodeficiency virus-1, hepatitis B virus and enterotoxigenic *Escherichia coli*. Gene 165: 163-171.
56. Bäckström, M., Lebens, M., Schödel, F. y Holmgren, J. 1994 .Insertion of a HIV-1-neutralizing epitope in a surface-exposed internal region of the cholera toxin B subunit. Gene 149:211-217.
57. González, R., Sánchez, J., Holmgren, J., López, S. y Arias, C. 1993 .Immunological characterization of a rotavirus-neutralizing epitope fused to the cholera toxin B subunit. Gene 133: 227-232.
58. Ryan, E.T., Bitterton, J.R., Zhang, T., Baker, M.A., Stanley, S.L.Jr. y Calderwood, S.B. 1997 .Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody. Infect Immun. 65(8): 3118-3125.
59. Paniagua-Solís, J., Sánchez, J., Ortiz, V., González, C. e Isibasi, A. 1996. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal

antibodies against *Salmonella typhi* Omp C peptide loops. FEMS Microbiol. Lett. 141: 31-36.

60. Paniagua-Solís, J., Martín, O., Ortiz, V., Ramírez, G., González, C. e Isibasi, A. 1995 . Predicted epitopes of *Salmonella typhi* Omp C porin are exposed on the bacterial surface. Immunol. & Infect. Dis. 5:244-249.

61. Sánchez, J. y Holmgren, J. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B-subunit as a basis for vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:481-485.

62. Sánchez, J., Johansson, S., Lowenadler, B., Svennerholm, A.M. y Holmgren, J. 1990. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion protein for oral vaccination. Res. Microbiol. 141:971-979.

63. Bolivar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J. Betlach, M.C. Heyneke, H.L. y Boyer, H.W. 1977 . Construction and characterization of new cloning vehicle II. A multipurpose cloning system. Gene 2(2): 95-113.

64. Gratham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. y Mercier, R. 1981 . Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. Nucleic Acid Res 9:43-74.

65. Svennerholm, A.M. y Holmgren, J. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA). Curr. Microbiol. 1:19-23.

66. Puente, J.L., Juárez, D., Bobadilla, M., Arias, C.F. Calva, E. 1995. The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. Gene 156:1-9.

67. Van der Ley, P., Heckels, J.E., Virji, M., Hoogerhout, P. y Poolman, J.T. 1991. Topology of the outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* species. Infect. immun. 59: 2963-2971.

68. Srikumar, R., Dahan, D., Gras, M.F., Ratcliffe, M.J., Alphen. L. y Coulton, J.W. 1992. Antigenic sites on porin of *Haemophilus influenzae* type b: mapping with synthetic peptides and evaluation of structure predictions. J. Bacteriol. 174(12): 4007-4016.

69. Yi, K. y Murphy, T.F. 1994. Mapping of a strain-specific bactericidal epitope to the surface-exposed loop 5 on the P2 porin protein of non-typeable *Haemophilus influenzae*. Microb. Pathog. 17: 277-282.

70. Newton, S., Klebba, P., Michel, V., Hofnung, M. y Charbit, A. 1996. Topology of the membrane protein lamB by epitope tagging and a comparison with the x-ray model. J. Bacteriol. 178(12): 3447-3456.

71. Lycke, N., Karisson, U., Sjolander, a y Magnusson, K.E. 1991. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand. J. Immunol.* 33, 691.
72. Lycke, N., Bromander, A., Ekman, L., Karisson, U y Holmgren, J. 1989. Cellular basis of immunomodulation by cholera toxin *in vitro* with possible association to the adyuvant function *in vitro*. *J. Immunol.* 142,20.
73. Lebman, D.A., Fuhrman, J.A. y Cebra, J.J. 1988. Intraduodenal application of cholera holotoxin increases the potential of clones from Peyer's patch B cell of relevant and unrelated specificities to secrete IgG and igA. *Reg. Immunol.* 1,32.