

11281 43



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"EVALUACION DE UN SISTEMA PARA INCREMENTAR  
LA EXPRESION DE PROTEINAS RECOMBINANTES  
EN LA CEPA VACUNAL *Salmonella typhi* CVD908"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
PRESENTA:

M. C. ARACELI ELVIRA SANTIAGO MACHUCA



MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

**El presente trabajo doctoral fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología, Hospital de Infectología, del Centro Médico Nacional "La Raza". Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. César R. González Bonilla.**

## DEDICATORIA

***Dedico este trabajo a dos personas muy especiales en mi vida, a la Sra. Aurelia Machuca y al Sr. Juan Santiago, mis padres. Por el cariño y apoyo incondicional que me han brindado en todos mis planes, y haber culminado una meta más de mi vida. Con mucho amor y admiración, gracias papás.***

# INDICE

Página

<b>SUMMARY</b> .....	6
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>1.-ANTECEDENTES</b> .....	8
Acarreadores bacterianos .....	11
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
<i>Shigella sp.</i> .....	12
<i>Salmonella sp</i> .....	14
<i>S. typhi</i> CVD908 y <i>S. typhi</i> CD908- <i>htrA</i> .....	16
Sistemas Moleculares de expresión de proteínas recombinantes .....	18
Sistemas de integración cromosómica .....	18
Promotores .....	20
Sistema del fago T7 .....	22
<b>2.-JUSTIFICACION</b> .....	27
<b>3.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	28
<b>4.-HIPOTESIS</b> .....	28
<b>5.-OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
<b>6.-OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	29
<b>7.-MATERIAL Y METODOS</b> .....	30
<b>7.1 Técnicas del DNA recombinante</b> .....	30
<b>7.2 Reactivos empleados</b> .....	30
7.2.1 Cepas bacterianas empleadas .....	30
Tabla-I .....	30
7.2.2 Plásmidos empleados .....	31

Tabla-2	31
7.2.3 Oligonucleótidos empleados	32
Tabla-3	32
7.3 Caracterización de cepas bacterianas	33
7.4 Cepas bacterianas y medios de cultivo	34
7.5 Construcción de la cepa <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroC-rt7rnapol	34
7.6 Caracterización genotípica de la cepa <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	35
7.7 Secuenciación del locus <i>aroC</i> en la cepa integrante <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	36
7.8 Obtención de los plásmidos reporteros pIQ-LUC y pIQ- $\beta$ GAL	36
7.9 Evaluación de la expresión de la T7 RNA polimerasa en <i>E. coli</i> SY327	37
7.10 Evaluación de la expresión de la T7 RNA polimerasa en <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	37
7.11 Evaluación de la actividad de la luciferasa	38
7.12 Evaluación de la actividad de la $\beta$ -Galactosidasa	38
<b>8.-RESULTADOS</b>	39
8.1 Caracterización genotípica y fenotípica de cepas bacterianas	39
8.2 Obtención de la cepa <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	39
8.3 Secuenciación del sitio de integración del gene de la T7 RNA polimerasa en <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	41
8.4 Evaluación de la expresión de la T7 RNA polimerasa en <i>E. coli</i> y <i>S. typhi</i>	42
8.5 Obtención de los genes reporteros bajo el promotor pT7	43
8.6 Evaluación de la actividad de la luciferasa en el sistema de complementación en <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	44
8.7 Evaluación de la actividad de la $\beta$ -Galactosidasa en el sistema de complementación en <i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol	44
<b>9.-DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	46
<b>10.-FIGURAS</b>	
Figura-1	50
Figura-2	51
Figura-3	52
Figura-4	53

<b>Figura-5</b>	54
<b>Figura-6</b>	55
<b>Figura-7</b>	56
<b>Figura-8</b>	57
<b>Figura-9</b>	58
<b>Figura-10</b>	59
<b>Figura-11A</b>	60
<b>Figura-11B</b>	61
<b>Figura-11C</b>	62
<b>Figura-12</b>	63
<b>Figura-13</b>	64
<b>Figura-14</b>	65
<b>Figura-15</b>	66
<b>Figura-16</b>	67
<b>Figura-17</b>	68
<b>Figura-18</b>	69
<b>Figura-19</b>	70
<b>Figura-20</b>	71

<b>11.-REFERENCIAS</b>	72
------------------------	----

## SUMMARY

Attenuated *Salmonella* strains with defined gene deletions have been extensively evaluated as suitable live carriers of passenger antigens. A number strategies for antigen delivery by these strains have been attempted, ranging from plasmid based to chromosomal integration systems. We report here the chromosomal integration of the T7 RNA polymerase gene (*T7pol*) in the attenuated strain *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) CVD908 (*aroC*<sup>-</sup>, *aroD*<sup>-</sup>). The *T7pol* gene encoding was amplified by PCR from *Escherichia coli* BL21(DE3) and cloned in pNir3 plasmid under the control of the anaerobically inducible *nirB* promoter, then it was subcloned in a pKTN701 derivative, suicide plasmid with the R6K *ori*, and flanked by the *aroC* gene. After evaluating its functionality in *E. coli* SY327, the *aroC-T7pol-aroC* cassette was integrated into the *aroC* locus of *Salmonella typhi* CVD908 by homologous recombination. The resulting strain *S. typhi* CVD908-T7pol was able to transcomplement two plasmids bearing the *luc* or the *lacZ* reporter genes controlled by the T7 promoter, and produce luciferase and  $\beta$ -galactosidase in anaerobic culture conditions. Therefore, an inducible system for recombinant antigen production in attenuated *S. typhi* was achieved.



## RESUMEN.

Se han utilizado ampliamente las cepas atenuadas de *Salmonella* con deleciones genéticas definidas como posibles acarreadores vivos de antígenos. Para ello, se han intentado diversas estrategias para lograr la administración de antígenos, las cuales incluyen sistemas basados en plásmidos o en integración cromosómica. En este trabajo se reporta la integración cromosómica del gene de la T7 RNA polimerasa (*T7pol*) en la cepa atenuada de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) CVD908 (*aroC*<sup>-</sup>, *aroD*<sup>-</sup>). El gene que codifica para la *T7mapol* se amplificó por PCR de *Escherichia coli* BL21(DE3) y se clonó en el plásmido pNir3, bajo el control de promotor *nirB* inducible en anaerobiosis, posteriormente fue subclonado en un plásmido suicida derivado de pKTN701, con el *ori* R6K y flanqueado por el gene *aroC*. Después de evaluar su funcionalidad en *E. coli* SY327, el cassette *aroC-T7pol-aroC* fue integrado en el locus *aroC* de *Salmonella typhi* CVD908 mediante recombinación homóloga. La cepa resultante *S. typhi* CVD908 $\Omega$ *aroC-t7mapol* fue capaz de transcomplementar dos plásmidos conteniendo los genes reporteros *luc* o *lacZ* controlados por el promotor T7 y producir luciferasa o  $\beta$ -galactosidasa en condiciones anaeróbicas de cultivo. Consecuentemente, se logró obtener un sistema inducible para la producción de antígenos recombinantes en la cepa vacunal de *S. typhi*.

## **1.- ANTECEDENTES**

Actualmente existen numerosos problemas de salud pública que requieren de atención mundial. Enfermedades infecciosas como el SIDA, la tuberculosis, el paludismo o la leishmaniasis y no infecciosas como diferentes tipos de cáncer o el asma, son cada vez más frecuentes. Para lograr su control es necesario mejorar el nivel de vida de la población, establecer medidas preventivas, diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado. Sin embargo, el empleo de vacunas ofrece una posibilidad de control efectivo para muchas enfermedades aún en las condiciones económicas más desfavorables. Por ello, diversas instituciones mundiales como la Organización mundial de la Salud (OMS) han impulsado el desarrollo de la biotecnología en el área de la salud con el objetivo de desarrollar vacunas nuevas y mejorar las existentes.

Las vacunas convencionales consisten en microorganismos completos atenuados o inactivados, en productos derivados de microorganismos o en fracciones subcelulares. Sin embargo, han surgido nuevas variantes, una de las cuales consiste en bacterias atenuadas que funcionan como acarreadores vivos de antígenos. Es decir, vectores bacterianos que producen proteínas recombinantes de parásitos, bacterias, virus, o incluso antígenos tumorales. Estas bacterias atenuadas se administran por vía oral y generan respuesta inmune contra el acarreador bacteriano y contra el antígeno o antígenos “pasajeros” o “heterólogos”. Las bacterias que se han empleado con esta finalidad incluyen cepas atenuadas de enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* o *V. cholerae*.

Entre las ventajas que presentan este tipo de vacunas destaca su capacidad de generar respuesta inmune protectora sistémica y en mucosas, su bajo costo de producción, su estabilidad, el hecho de que se administran por la vía oral y la posibilidad de ser multivalentes. Los resultados obtenidos con el uso de bacterias atenuadas como

vectores de expresión de antígenos recombinantes en modelos murinos generaron gran confianza sobre su éxito en humanos. Sin embargo, debido a que los ensayos clínicos han sido desalentadores, es clara la necesidad de mejorar los sistemas de expresión y la estabilidad de los antígenos recombinantes.

El prerrequisito para que una cepa bacteriana funcione como acarreadora de antígenos consiste en que debe ser atenuada, pues debe ser segura sobre todo cuando se administre a niños o personas inmunosuprimidas. En tanto que la atenuación se logra introduciendo mutaciones en genes de vías metabólicas esenciales, el riesgo de reversión se elimina cuando se introducen más de una mutación en el genoma bacteriano. Por otro lado, no solo las características fisicoquímicas propias del antígeno, como son su hidrofiliicidad, determinan una respuesta inmune eficiente, sino que intervienen aspectos como la cantidad de antígeno recombinante que se produce y su localización subcelular dentro del acarreador. Por ello, en su diseño hay que considerar variables como el tipo de promotor, los codones de uso y las señales de localización celular.

La primera estrategia para lograr expresión suficiente de antígenos heterólogos consiste en el uso de plásmidos de expresión multicopia; sin embargo, estos plásmidos se pierden rápidamente *in vivo* cuando falta la presión selectiva de los antibióticos, con lo que decae la producción del antígeno heterólogo. Otra posibilidad radica en la integración de los genes heterólogos en el genoma de los acarreadores bacterianos; con lo cual se logra estabilidad y persistencia del gene heterólogo; sin embargo, se disminuye el nivel de expresión de la proteína recombinante debido a la presencia de una sola copia del gene, generando respuestas inmunes parciales o de corta duración. Una alternativa para garantizar la persistencia del gene heterólogo sin afectar su nivel de expresión descansa en el empleo de plásmidos estables, los cuales son heredados en todas las células hijas bacterianas en ausencia de antibióticos, pues contienen mutaciones en genes de partición o transcomplementan cepas mutantes con deleciones en genes vitales.

Otro aspecto fundamental en la funcionalidad de los acarreadores bacterianos, es la persistencia de la expresión del antígeno *in vivo*; es decir, la permanencia de la proteína recombinante durante la fase de infección del acarreador. La permanencia del plásmido o del gene heterólogo no garantiza la persistencia en la expresión de la proteína recombinante, pues ésta depende del promotor empleado para dirigir la expresión. Los promotores inducibles *in vivo* presentan mayores ventajas que los constitutivos, ya que se activan de manera natural cuando el acarreador se encuentra en el hospedero y persistiendo la producción de la proteína recombinante hasta la eliminación de la bacteria acarreadora, en cambio los promotores que se inducen *in vitro* producen una cantidad de antígeno inicial que luego se agota, pues no continua su expresión *in vivo*.

En este trabajo se presenta la construcción de una cepa de *Salmonella typhi* concebida para mejorar la estabilidad del gene heterólogo e incrementar la producción y la persistencia de proteína recombinante mediante la utilización del promotor *pnirB* y del sistema de expresión de proteínas recombinantes del fago T7. El sistema T7 propuesto presenta diversas ventajas sobre otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes, sobre todo por la alta especificidad de la T7 RNA polimerasa por su promotor, así como su alta estabilidad comparada con otras RNA polimerasas de bacterias gram negativas, lo que garantiza la síntesis de gran cantidad de proteína de manera selectiva.

El gene de la T7 RNA polimerasa se fusionó río abajo del promotor *pnirB* y se integró en el locus *aroC* de la cepa vacunal *Salmonella typhi* CVD908 mediante recombinación homóloga usando plásmidos suicidas. La cepa resultante expresó la T7 RNA polimerasa de manera inducible a bajas concentraciones de oxígeno y fue capaz de transcomplementar plásmidos conteniendo los genes reporteros de la luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa controlados por el promotor T7. Los resultados obtenidos *in vitro* indican que esta cepa vacunal tiene un gran potencial en el desarrollo de vacunas heterólogas estables *in vivo*.

### **Acarreadores bacterianos**

Un acarreador bacteriano es una cepa atenuada que tiene la capacidad de producir proteínas recombinantes de otros microorganismos, las cuales se conocen como heterólogas o pasajeras. Sin embargo, también pueden acarrear plásmidos que llevan genes bajo el control de un promotor eucariótico de tal manera que la célula huésped se encarga de su transcripción y traducción de manera semejante a lo que sucede en una infección viral. Los acarreadores vivos se han empleado en el desarrollo de nuevas vacunas y en el área biotecnológica, para la producción de proteínas recombinantes funcionales. Entre los acarreadores bacterianos con mayores posibilidades para ser utilizados en seres humanos se incluyen cepas atenuadas de *Escherichia sp*, *Shigella sp*, *Salmonella sp* y *Listeria sp*.

#### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria* es una bacteria intracelular facultativa, la cual infecta células epiteliales y macrófagos. *L. monocytogenes* evade el ambiente fagolisosomal, pues tiene capacidad de salir hacia el citosol de la célula huésped. Considerando que una vez en el citosol la bacteria muere y es procesada por la vía endógena generando péptidos inmunogénicos, que son presentados en el contexto de moléculas del MCH de clase I a los linfocitos T citotóxicos, se ha propuesto que este acarreador puede expresar antígenos recombinantes de parásitos, bacterias ó virus de residencia intracelular, donde la respuesta por linfocitos T citotóxicos es importante en la eliminación del microorganismo. Algunas proteínas de *Listeria sp*. funcionan como adyuvantes induciendo la activación de linfocitos T cooperadores Th1 en el sitio de la infección, así como la activación de linfocitos T citotóxicos. La activación de estas dos estirpes celulares eliminan rápidamente a *Listeria sp* evitando el desarrollo de la enfermedad y garantizando la bioseguridad del acarreador<sup>1</sup>. Al igual que *Salmonella* esta bacteria también es capaz de generar respuesta inmune en mucosas y se ha propuesto como un vehículo de

transporte de vacunas de DNA<sup>2</sup>. Finalmente, también se ha propuesto su uso en el área veterinaria para la inmunización de peces<sup>3</sup>.

Se ha logrado atenuación de *Listeria* modificando diversos genes como *ctpA* que codifica para una ATPasa<sup>4</sup> y las cepas resultantes se han utilizado como acarreadoras de antígenos virales, como la gp120 del HIV-1<sup>5</sup> e incluso tumorales con resultados prometedores, pues una mutante del gene *mpl2* que expresa un antígeno asociado al tumor (TAA) de fibrosarcoma promovió una protección del 55 al 64 % en ratones vacunados<sup>6</sup>. Dentro de las ventajas que presenta el uso de *Listeria* como acarreador bacteriano se encuentra el hecho de que provee protección, tanto contra el antígeno heterólogo como contra la listeria misma. Aspecto importante, considerando que en algunas regiones, donde se ingiere agua contaminada por esta bacteria, la infección puede constituir un verdadero problema de salud pública<sup>7,8</sup>. Sin embargo, existen problemas inherentes a su facultad de modificar el comportamiento de las células huésped que cuestionan su seguridad, pues hay evidencias de que puede generar desordenes en la movilidad y adhesión celulares por su capacidad de movilizar actina. Por ello, debe reconsiderarse la bioseguridad de estas cepas y su uso como acarreador vacunal<sup>9</sup>.

### ***Shigella sp.***

Esta bacteria tiene la capacidad de invadir células epiteliales y escapar de la vacuola fagocítica al citoplasma. Una vez en el citosol la bacteria atenuada se multiplica dependiendo de la auxotrofia que presente, posteriormente es destruida permitiendo la liberación de la proteína recombinante o plásmido al citosol de la célula huésped. *Listeria* y *Shigella* escapan del fagosoma y se desplazan a través del citoplasma, inducen polimerización del citoesqueleto, causan muerte por lisis o apoptosis<sup>10</sup>, permitiendo la diseminación a las células adyacentes<sup>11,12</sup>.

Las modificaciones genéticas realizadas en *Shigella* han dado como resultado cepas demasiado atenuadas incapaces de despertar respuesta inmune efectiva, o cepas que no han perdido totalmente su virulencia, que son inadecuadas para ser utilizadas como acarreadores vacunales. Sin embargo, una característica importante de las cepas atenuadas sobre las inactivadas es que inducen mejor respuesta inmune protectora <sup>13</sup>.

Entre las primeras cepas atenuadas de *Shigella* se encuentran las que contienen deleciones en los genes *aro*, los cuales están implicados en la síntesis de metabolitos aromáticos no disponibles en tejidos de mamíferos<sup>14</sup>. También se han construido cepas atenuadas con deleciones en los genes *virG* y *thyA*, que sin embargo, en un modelo de cobayo no resultaron completamente seguras <sup>15</sup>. La cepa vacunal CVD1203, que contiene deleciones en los genes *aroA* y *virG*, generó altos títulos de IgA protectores en mucosas, tanto contra la cepa silvestre virulenta *S. flexneri* 2a <sup>16</sup> como al utilizarla para expresar antígenos de *E. coli* enterotoxigénica<sup>17</sup>. Cepas de *Shigella sonnei*, manipuladas genéticamente en el gene *virG* de manera similar a *Shigella flexneri*, inducen protección en modelo de queratoconjuntivitis de cobayo<sup>18</sup>.

La cepa vacunal *Shigella flexneri* 2a CVD1207 por otra parte, contiene deleciones en los genes *virG*, *sen*, *set* y *guaBA*, invade células epiteliales pero no se propaga intercelularmente debido a la deleción que presenta en *virG*, no produce enterotoxinas por carecer de la función de los genes *sen* y *set* y es de proliferación limitada *in vivo* por contener una deleción en el gene *guaBA*. Los ensayos clínicos en humanos muestran que es una cepa vacunal altamente atenuada, pero incapaz de generar respuesta inmune protectora ante el reto de la forma virulenta<sup>19</sup>.

*Shigella flexneri* ha sido utilizada ampliamente como vector de expresión de proteínas recombinantes y como acarreador de plásmidos de expresión eucarióticos. De hecho, esta fue la primera bacteria acarreadora usada exitosamente en la vacunación con

DNA, al demostrar la expresión de  $\beta$ -galactosidasa en el citosol de células infectadas por estas bacterias, las cuales acarreaban el gened de la  $\beta$ -galactosidasa bajo el promotor temprano de citomegalovirus (pCMV)<sup>20</sup>. Entre los antígenos que se han expresado en cepas atenuadas de *Shigella*, se encuentran virales, como DNA del virus del sarampión<sup>21</sup>, o la proteína VP1 de poliovirus<sup>22</sup>; antígenos bacterianos como las proteínas CS2 y CS3 de *E. coli* enterotoxigénica<sup>23</sup> o el fragmento carboxi terminal de la toxina de tétanos<sup>24</sup> y antígenos propios de *Shigella* dentro de cepas más atenuadas, como la subunidad B de la toxina shiga<sup>25</sup>.

Los efectos colaterales de las bacterias aún atenuadas, relacionados con su fisiopatología, limitan su uso como vectores vivos, en el caso de *Shigella* se ha reportado recientemente que la infección con esta bacteria reduce la expresión de péptidos antibacterianos como LL-37 y  $\beta$ -defensina-1. Aunque no se conocen los factores causantes de esta disregulación, se cree podrían estar codificadas en el plásmido de virulencia de *Shigella*<sup>26</sup>. Otros problemas de *Shigella* como acarreador incluyen la aparición de cepas resistentes a diferentes antibióticos<sup>27</sup>, su capacidad de transferir información genética, a través del plásmido de virulencia que puede mobilizarse horizontalmente o mediante proteínas de virulencia que se transferieren como vesículas a células adyacentes<sup>28</sup>. Por tanto, el uso de *Shigella* como cepa vacunal debe ser aún motivo de controversia.

### ***Salmonella sp.***

La *Salmonella sp* es uno de los acarreadores más empleados en el desarrollo de vacunas recombinantes para uso exclusivo en humanos. Actualmente se han expresado más de 60 antígenos pasajeros diferentes en este acarreador<sup>29,30</sup>, incluyendo antígenos bacterianos, virales y de parásitos<sup>29,30,31, 32</sup>. Además, se ha utilizado para expresar mediadores del sistema inmunológico como citocinas, con la finalidad de modular células del sistema



inmunológico en primera instancia<sup>33</sup>.

*Salmonella* ofrece algunas ventajas teóricas sobre otras enterobacterias para ser utilizada como acarreador, infecta al humano por la vía oral<sup>34</sup>, lo cual la hace un acarreador ideal para ser empleada en enfermedades donde la respuesta inmune más importante es la generada en las mucosas. Su costo de producción es menor a las vacunas convencionales y no requiere de la infraestructura necesaria para la administración de otros productos biológicos, como son condiciones de refrigeración, equipo, jeringas y personal entrenado<sup>35</sup>. *S. typhi* estimula además inmunidad sistémica de tipo humoral y celular, tanto hacia sus antígenos propios como a los heterólogos<sup>36</sup>. Esto es importante en la obtención de vacunas polivalentes ya que se logra protección contra el antígeno acarreado y contra la propia *Salmonella*. Por ello, podría considerarse como una alternativa de vacunación en países en vías de desarrollo como México, donde la fiebre tifoidea sigue siendo un problema de salud pública debido a la deficiente infraestructura sanitaria que prevalece<sup>37</sup>.

Actualmente, se han construido cepas mutantes con diferentes grados de atenuación, algunas de las cuales se encuentran en ensayos clínicos de fase II. La cepa atenuada *AguaAB*, que tiene interrumpida la biosíntesis de nucleótidos de guanina, resultó ser sobreatenuada; sin embargo, al ser utilizada como acarreador de antígenos heterólogos demostró la inducción de títulos altos de anticuerpos contra el fragmento C de la toxina del tétanos<sup>38</sup>. Por otra parte, también se han elaborado cepas con deleciones en los genes *cya*, *crp* y *cdt*, y que han sido evaluadas como acarreadores vacunales<sup>39</sup>. Otra alternativa consiste en la deleción de los genes *aro*, que codifican para enzimas de la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos. La cepa BRD691 derivada de *S. typhi* Ty2, contiene deleciones en los genes *aroA* y *aroC*, a partir de ella se obtuvo la cepa BRD1116 con una tercera deleción en el gene *htrA*<sup>40</sup>. Aunque la función de la proteína HtrA no es bien conocida, se ha demostrado que las mutantes en *aro* que contienen una

delección adicional en el gen *htrA* reducen significativamente su sobrevivencia intracelular en células epiteliales *in vitro* e *in vivo*, sin alterar su capacidad de invasión o de estimulación para la producción de citocinas proinflamatorias como IL-8<sup>40</sup>. Existe una cepa atenuada semejante a la cepa BRD1116, denominada CVC10-80 que presenta delecciones en los genes *aroD*, *aroA* y *htrA*, y ha sido evaluada en ensayos de fase I demostrando ser biosegura y candidata potencial para ser empleada como acarreador de antígenos recombinantes<sup>41</sup>. Sin embargo, la mayoría de ensayos para evaluar cepas atenuadas de *Salmonella typhi* como acarreadores de antígenos heterólogos se han realizado en las mutantes *aro* CVD908 y CVD908 *htrA*.

#### ***S. typhi* CVD908 y *S. typhi* CD908-*htrA*.**

La cepa vacunal *S. typhi* CVD908 fue generada en el Centro para el Desarrollo de Vacunas (CVD), en la Universidad de Maryland en Baltimore (UMAB, Baltimore, Maryland EUA), es auxotrófica para amino ácidos aromáticos debido a que presenta delecciones en los loci *aroC* y *aroD*<sup>42</sup>, por tanto su replicación es limitada. En ensayos clínicos de fase I-II esta cepa mostró ser inmunogénica y segura<sup>43</sup> y se ha empleado para expresar diversos antígenos heterólogos con fines vacunales obteniéndose resultados variables. Por ejemplo, fue empleada para expresar la proteína gp120 del virus HIV-1 y en ratones BALB/c fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral contra el virus<sup>44</sup>. Se han utilizado para expresar simultáneamente los factores de colonización CFA/I y CS3 de *E. coli* enterotoxigénica,<sup>45</sup> la proteína circunsporozoítica (CSP) de *P. falciparum*<sup>47</sup> y de la proteína GP63 de *Leishmania mexicana*<sup>46</sup>. La administración oral de la cepa vacunal de *S. typhi* CVD908-ΩCSP en voluntarios humanos dió como resultado una respuesta de anticuerpos a la CSP y linfocitos T citotóxicos específicos a la proteína CSP.<sup>47</sup> Por otra parte, la cepa CVD908-GP63 fue capaz de inducir inmunidad protectora de tipo Th1, así como la generación de linfocitos T citotóxicos específicos en ratones.<sup>46</sup>

La cepa vacunal *S. typhi* CVD908 fue sometida a una tercera mutación en el gene *htrA*, generando una cepa más segura para su uso en humanos<sup>48</sup>. Esta cepa vacunal llamada *S. typhi* CVD908-htrA, resultó ser mas atenuada que la anterior pero aún capaz de multiplicarse varias veces en el huésped. En esta cepa se ha expresado el fragmento C de la toxina de tétanos y ha inducido la producción de anticuerpos en humanos<sup>49</sup>. Se ha expresado también la molécula modificada CRM(197) de la toxina de difteria, utilizando el sistema de secreción de tipo I de la hemolisina A de *E. coli* uropatogénica se logró la secreción pobre de la proteína recombinante pero se indujeron anticuerpos específicos<sup>50</sup>. En lo que respecta a antígenos de parásitos, se han expresado proteínas de *Plasmodium falciparum*, dentro de las que encontramos la proteína de superficie del merozoito<sup>51</sup>, y una forma truncada secretable de la proteína de superficie del esporozoito (SSpf2)<sup>52</sup>.

El uso de *S. typhi* como acarreador de antígenos es muy alentador pues no se han reportado reacciones colaterales importantes; sin embargo, los resultados en cuanto a la inmunogenicidad de los antígenos pasajeros es muy variable. Son muchos los factores que pueden determinar su eficiencia, tales como la naturaleza del antígeno, la compatibilidad de codones de uso con el acarreador, la cantidad de antígeno disponible, su localización subcelular en el acarreador, el número de copias del plásmido, el tipo de promotor empleado para dirigir la expresión del antígeno, la vía de administración o el esquema de inmunización. Actualmente se está trabajando en la estabilización de los antígenos heterólogos, de tal forma que se logre grandes cantidades de antígeno, ya sea mediante el empleo de plásmidos estables o desde genes integrados en el cromosoma bacteriano, se está estudiando el papel de la localización subcelular del antígeno en el acarreador en la inducción de la respuesta inmune y se están probando diversas vías de inmunización buscando generar la mejor respuesta inmune en mucosas. Los resultados obtenidos en voluntarios humanos, por ejemplo, muestran que la vía oral induce una respuesta inmune más pronunciada en boca y vagina, mientras que la inmunización por la vía rectal, induce mejor respuesta inmune nasal, en intestino y conjuntiva<sup>53</sup>.

### **Sistemas moleculares de expresión de antígenos recombinantes en acarreadores bacterianos.**

Los sistemas de expresión de antígenos recombinantes bacterianos incluyen al gene de interés, el promotor, la RNA polimerasa, así como moléculas accesorias necesarias como el factor  $\sigma$  correspondiente al promotor, el cual es proporcionado por la bacteria acarreadora. La información genética que codifica para cada uno de estos componentes se encuentra integrada en el genoma bacteriano o insertada en plásmidos y su interacción coordinada y permanencia permite la expresión y estabilidad de proteínas. Son pocos los sistemas que se han diseñado para estabilizar la permanencia del gene heterólogo, una de esas estrategias consiste en la integración en el genoma bacteriano del gene de interés bajo el control de un promotor bacteriano. La limitante de esta estrategia es la baja producción de la proteína recombinante debido a la presencia de una sola copia del gen dentro del cromosoma bacteriano. Sin embargo, existen otros sistemas para estabilizar los genes heterólogos y aumentar la producción del antígeno, estos sistemas se basan en el empleo de plásmidos multicopia, que permanecen sin perderse en el acarreador, ya que estos contienen genes esenciales para la sobrevivencia del acarreador, de tal manera que forzan al acarreador a mantener el plásmido indefinidamente<sup>54</sup>.

### **Sistemas de integración.**

La integración de genes heterólogos en el cromosoma de los vectores bacterianos tiene como objetivo garantizar la permanencia del gene dentro de la bacteria y con ello la expresión de la proteína recombinante. Entre las ventajas sobre los sistemas basados en plásmidos, esta estrategia garantiza que la información genética foránea se elimina al mismo tiempo que la bacteria muere. Es decir, la información genética heteróloga únicamente se hereda de forma vertical, mientras que con el empleo de plásmidos se corre el riesgo de que la información genética heteróloga pueda heredarse de forma

horizontal a bacterias vecinas o adyacentes. Con el riesgo adicional de que la mayoría de los plásmidos de expresión poseen genes resistencia a antibióticos.

Las estrategias más frecuentemente empleadas para introducir de manera estable genes en el cromosoma bacteriano consisten en la inserción de transposones y en la integración por recombinación homóloga empleando plásmidos suicidas. Los transposones se utilizan ampliamente para realizar deleciones o inserciones de genes foráneos en el cromosoma bacteriano<sup>55, 56</sup>. Sin embargo, las integraciones con este sistema no se realizan en sitios dirigidos, pues las inserciones ocurren al azar, interrumpiendo secuencias o genes con consecuencias funcionales indeterminadas. Para la integración de genes foráneos es más conveniente utilizar como blanco una región bien determinada en el cromosoma de la bacteria, en donde se pueda insertar el gene de interés sin afectar la función de otros genes. En el caso de las cepas atenuadas que se obtienen por ingeniería genética, se prefiere que el gene pasajero de interés ocupe la región cromosomal de los *loci* previamente deletados. La integración se realiza por recombinación homóloga empleando plásmidos suicidas, los cuales contienen el gene pasajero flanqueado por regiones homólogas a una región del cromosoma bacteriano, también contienen un origen de replicación (*ori*) que no es funcional en la cepa receptora y contienen uno o dos marcadores de selección como genes de resistencia a antibióticos o de sensibilidad a ciertos metabolitos. Las secuencias laterales que flanquean al gene pasajero en el plásmido suicida, permiten la recombinación homóloga e integración de todo el plásmido o "cassette" en el cromosoma bacteriano, dando origen al estadio transitorio de cointegración. Mediante un segundo evento de recombinación, el plásmido suicida es expulsado del cromosoma bacteriano dejando el gene pasajero insertado en el cromosoma. Empleando plásmidos suicidas se ha logrado integrar genes heterólogos en el cromosoma de *S. typhimurium*<sup>57</sup> y *S. typhi*<sup>47</sup>. Se han diseñado además sistemas de integración fáciles de rastrear por el uso de marcadores de resistencia a antibióticos, por ejemplo, la integración del marcador de resistencia a

eritromicina en el cromosoma de *Streptococcus thermophilus*, permite seleccionar con facilidad clonas integrantes al sustituir este gene por la secuencia de interés, mediante la selección de clonas sensibles a eritromicina<sup>58</sup>. Otro sistema diseñado para evidenciar la integración de genes en el cromosoma de *Salmonella sp* y *E. coli* incluye el uso del gene *sacB*, el cual confiere sensibilidad a sacarosa en bacterias gram-negativas. Durante la integración cromosómica el gene *sacB* es sustituido por el gene pasajero, confiriendo resistencia a la sacarosa. Las cepas que no recombinan con el gene pasajero se lisan en medios que contienen grandes cantidades de sacarosa, aumentando la eficiencia de integración hasta un 50%<sup>59</sup>.

#### **Promotores.**

El promotor es una secuencia de DNA a la que se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción. En procariones el gene que será transcrito se encuentra siempre a la derecha (rio abajo) de la secuencia que constituye al promotor. En la selección del promotor se consideran diversos factores como su fuerza, regulación, sencillez y la especificidad. Los promotores se pueden clasificar en dos grupos, los promotores inducibles y promotores constitutivos.

#### **Promotores Constitutivos**

Los promotores constitutivos son aquellos que regulan la expresión de genes que se encuentran siempre activados, produciendo proteína esencial en todo momento para la bacteria. Generalmente son proteínas necesarias en el metabolismo basal celular que forman estructuras o participan en actividades metabólicas bacterianas. Un ejemplo es el promotor *flgK*, el cual controla la expresión de las proteínas *flbF*, *flgK*, *flgL* y *orfX*, necesarias para la motilidad de *Borrelia burgdorferi*. Este promotor ha sido empleado en *E. coli* y *S. typhimurium*<sup>60</sup>. Otros posibles promotores son los que regulan el operón flagelar en *Salmonella sp* y *E. coli*, dependientes del factor  $\sigma 28$ . La secuencia consenso de estos promotores es TAAAGTTT N11 GCCGATAA<sup>61</sup>.

### **Promotores inducibles**

Los promotores inducibles son aquellos que regulan la expresión de proteínas bajo ciertas condiciones celulares internas o externas como son: temperatura, pH, fuerza iónica, concentraciones de oxígeno, carbohidratos o aminoácidos. Estos promotores se dividen en dos tipos, los inducibles *in vivo* y los inducibles *in vitro*. El promotor *cysD* se regula por la concentración de cisteína presente en *E. coli* y *S. typhimurium*, la secuencia -10 de este promotor es TATAGT mientras que la región -35 es TTCATT<sup>62</sup>. Se ha estudiado también el promotor de los genes que participan en la degradación de la sacarosa en *Salmonella* sp, el cual forma parte de un operón que regula los genes *scrY*, *scrA* y *scrB*, y se sabe que este promotor es regulado por la proteína ScrR<sup>63</sup>. Dentro de los promotores regulados por factores externos encontramos los regulados por la acidez del medio como el promotor *asr*<sup>64</sup>, el cual se induce a pH de 4.0 a 5.0; el análisis de la secuencia de este promotor revela similitud a secuencias encontradas en promotores activados transcripcionalmente por la proteína PhoB. Por otra parte, se ha descrito el uso de sistemas de integración cromosomal que contienen promotores inducibles por calor como el promotor  $\lambda$ PL, con este promotor se ha expresando la T7 RNA polimerasa durante 2 minutos de choque térmico, tiempo suficiente para la producción de la polimerasa<sup>65</sup>. Los promotores que son activados a bajas temperaturas permiten la producción de proteínas que normalmente son inestables a temperaturas fisiológicas, debido a que entre 15 a 23 °C las proteasas celulares están inactivas, en este grupo encontramos el promotor *cspA*, el cual se ha evaluado en *E. coli*<sup>66</sup>.

El uso de cada uno de los tipos de promotores depende del objetivo deseado. En el desarrollo de vacunas con acarreadores se ha demostrado que la presencia del antígeno *in vivo* determina la eficiencia de la respuesta inmune. Por ello, se considera que los promotores más adecuados son *pnirB*, *ppagC*, *pKatG*<sup>67</sup>.

### **Promotores inducibles a bajas concentraciones de oxígeno.**

El promotor *pnirB* regula la expresión de la proteína NirB. El gene *nirB* se induce en presencia de nitritos y bajas concentraciones de oxígeno. El promotor *pnirB* ha sido empleado para expresar diversos antígenos en *E. coli*<sup>68</sup> y en *Salmonella* sp<sup>69</sup>. Por ejemplo, en la cepa *S. typhimurium* BRD509, que contiene deleciones en los genes *aroA* y *aroD*, se clonó la porción carboxilo terminal de la toxina A de *Clostridium difficile* bajo el control de *pnirB* y una sola inmunización fue capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos en un modelo murino<sup>70</sup>. Se ha demostrado en diversas construcciones que los plásmidos que acarrean este promotor son estables *in vitro* e *in vivo* en cepas de *S. typhimurium* SL3261<sup>71</sup>. Otro promotores regulados por oxígeno son los promotores *vgb*, *pdmsA1* y sus derivados. El primero, regula la expresión de la proteína Vgb, de tal manera que esta proteína únicamente se expresa a bajas concentraciones de oxígeno. Los derivados del promotor *pdmsA*, *pdmsA2* y *pdmsA3*, que fueron modificados por deleción de sus secuencias represoras, poseen mayor fuerza en la expresión de proteínas recombinantes que el promotor original.

En la actualidad para analizar y estudiar los diferentes tipos de promotores, frecuentemente se emplean proteínas reporteras, es decir, proteínas conocidas fáciles de identificar y cuantificar como por ejemplo, la luciferasa<sup>72,73</sup>  $\beta$ -galactosidasa y la acetil cloranfenicol transferasa<sup>74</sup>.

### **Sistema de expresión de antígenos recombinantes del fago T7**

El sistema de expresión de antígenos recombinantes del fago T7 está constituido por el promotor T7 y la T7 RNA polimerasa. Los integrantes del sistema muestran características interesantes que hacen ideal su uso en la expresión de antígenos recombinantes *in vitro* e *in vivo*.



### **Promotor T7**

El promotor del fago T7 consta de una región continua que contiene muy cercanos el sitio de reconocimiento de la T7 RNA polimerasa y el sitio de iniciación de la transcripción, lo que hace que el promotor sea de aproximadamente 27 pb. La diferencia de tamaño del promotor T7 con otros promotores de *E. coli*, permite que la T7 RNA polimerasa sea cinco veces más pequeña que las polimerasas de *E. coli*<sup>75</sup>. La secuencia consenso del promotor nativo es CAAAT TAATA CGACT CACTA TAGGG AG, donde los nucleótidos CAAAT están semiconservados<sup>76</sup>.

### **La T7 RNA polimerasa**

La T7 RNA polimerasa es una proteína de una sola cadena que no requiere de la presencia de factores adicionales para su actividad<sup>77</sup>, la proteína tiene un peso molecular de 107 kDa y es el producto del gene *t7 rna* polimerasa del fago DE3, es una proteína muy activa, su velocidad de polimerización es cinco veces más rápida que las polimerasas de *E. coli*. La T7 RNA polimerasa se ha estudiado ampliamente y se han determinado que entre los aminoácidos esenciales para su actividad se encuentra la Tyr639, pues la sustitución de este aminoácido altera el reconocimiento de la T7 RNA polimerasa entre deoxiribonucleótidos y ribonucleótidos *in vitro*, y también reduce la velocidad de polimerización<sup>78, 79</sup>. La T7 RNA polimerasa reconoce secuencias conservadas en el promotor T7 entre las posiciones -17 a +6 a partir del punto de inicio de la transcripción. Recientemente se obtuvo la estructura cristalográfica de la T7 RNA polimerasa con una resolución de 2.4 Å<sup>80, 81</sup> (figura 1).

### **Sistemas de complementación empleando el binomio T7.**

La cepa recomendada para la expresión de proteínas recombinantes con el sistema T7 es *E. coli* BL21(DE3), pues contiene el gene de la T7 RNA polimerasa integrado en su cromosoma en el gene *int* del bacteriófago DE3 derivado del fago  $\lambda$  bajo el control de

promotor lacUV5, el cual es inducible con la presencia de lactosa o un análogo como el IPTG<sup>82</sup>.

Se han descrito diversos sistemas de expresión de proteínas recombinantes empleando el promotor T7 y la T7 RNA polimerasa. Cada sistema contiene diferentes mecanismos de regulación de la expresión de la proteína recombinante. Por ejemplo, como ya se describió anteriormente la cepa de *E. coli* BL21(D3) ha sido empleada en la purificación de diferentes proteínas recombinantes empleando el promotor inducible lacUV5, sin embargo, se han diseñado otros sistemas de regulación de la expresión de la T7 RNA polimerasa en *E. coli* mediante el empleo de otros promotores que pueden ser inducidos por cambios de temperatura<sup>83</sup>.

Por otra parte, se han construido también otras bacterias diferentes a *E. coli* que poseen el sistema T7 como son *Pseudomonas aeruginosa*<sup>84</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>85</sup> y *Lactococcus lactis*<sup>86</sup>. En parásitos se integró el gen de la T7 RNA polimerasa en una cepa de *Trypanosoma brucei*, y su producto transcomplementó de manera estable con plásmidos que contenían el gene de una proteína de interés bajo el control del promotor T7<sup>87</sup>.

El integrar el gene de la T7 RNA polimerasa en el cromosoma del microorganismo estabiliza la expresión de la proteína recombinante, pero disminuye la cantidad de la proteína producida. Para fines biotecnológicos donde la proteína recombinante es producida en reactores, se recomienda el uso de plásmidos de expresión multicopia<sup>88, 89</sup>. La cantidad de proteína recombinante producida o fuerza de expresión depende del tipo de promotor empleado, algunos promotores que se han evaluado con el sistema T7 son el promotor pLac<sup>90</sup>, el promotor de fago lambda<sup>91</sup>, el promotor inducible por calor  $\lambda$ PL<sup>65</sup> y el promotor inducible por bajas concentraciones de oxígeno vgb<sup>92</sup>, los cuales al activarse bajo el estímulo correspondiente inician la producción de la T7 RNA polimerasa, la cual a su vez es altamente específica al promotor T7, y por lo tanto,

todo gene que se encuentre clonado bajo este promotor será transcrito y traducido a la proteína correspondiente.

Por otra parte, se ha demostrado que la sobre producción de algunas proteínas pueden ser tóxicas para la bacteria que las producen, este problema a llevado a diseñar sistemas cada vez más controlados que permiten expresar la proteína bajo condiciones más estrictas, como ejemplo de estos sistemas tenemos el uso de la T7 lisozima, la cual regula negativamente la actividad de la T7 RNA polimerasa<sup>93</sup>.

Dentro de las proteínas recombinantes de mayor relevancia que han sido producidas en bacterias por el sistema T7 se encuentran las proteasas de HIV<sup>94</sup>, la IL-6 de rata<sup>95</sup> y la IL-2 de ratón<sup>86</sup>. La T7 RNA polimerasa ha sido empleada también para la traducción de proteínas en sistemas *in vitro*, mediante el empleo de la polimerasa previamente sintetizada, extracto crudo bacteriano como fuente de ribonucleótidos, aminoácidos y ribosomas, y el gene sintético que se quiere expresar bajo el promotor T7<sup>96</sup>.

El sistema T7 no solo ha sido empleado en procariones, sino también en eucariotes. Es más problemático emplear el sistema T7 en eucariotes debido a la presencia de membrana nuclear en los organismos superiores, por lo que fue necesario enviar la T7 RNA polimerasa al núcleo donde se lleva a cabo la transcripción y producción de RNA mensajero, mediante la inserción de una secuencia señal de localización nuclear proveniente del antígeno T de SV40, en la región que codifica para la porción amino de la polimerasa. Con esta estrategia se logró aumentar la cantidad de T7 RNA polimerasa presente en el nucleoplasma y con ello, el aumento en la expresión de las proteínas recombinantes<sup>97</sup>.

Para aumentar la expresión de proteínas recombinantes en células mamíferas se han empleado otras estrategias. El uso de dos promotores como el CMV y el T7 ha dado resultados satisfactorios para este fin. El gene de la T7 RNA polimerasa, fue clonado

bajo el control de los promotores CMV y T7 , el promotor CMV induce la primera ronda de síntesis de la T7 RNA polimerasa, la T7 RNA polimerasa producida se une a su promotor, que a su vez inicia la producción de más polimerasa y con ello, finalmente la síntesis del gene de interés que se encuentra bajo el control del promotor T7. Con esta construcción se ha demostrado niveles de expresión altos de genes reporteros de manera sostenida por más de 7 días<sup>98</sup>.

Por otra parte, el virus vaccinia es el más empleado en la expresión de proteínas recombinantes en eucariotes. Cualquier gene que se encuentre bajo el control del promotor T7 en células eucariotas se transcribe cuando estas células se infectan por el virus híbrido<sup>99</sup>. Mediante este sistema se han expresado antígenos como la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, el antígeno de superficie del virus de hepatitis B, la polimerasa del virus de la hepatitis B<sup>100</sup>, las proteínas de la envoltura del VIH<sup>101</sup> y algunos neurotransmisores<sup>102</sup>. Las proteínas recombinantes producidas con estos sistemas de expresión pueden conservar sus propiedades funcionales, por ejemplo, las proteínas codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env* del retrovirus RSV producidas de manera recombinante empleando el virus vaccinia/T7, son ensambladas *in vitro* dando origen a partículas virales, las cuales por microscopía electrónica fueron indistinguibles de las producidas por células infectadas con el RSV silvestre<sup>103</sup>. Empleando el sistema T7 también se ha producido RNA mensajero antisentido contra el mensajero de la proteína nuclear del virus de la hepatitis C, el cual mostró tener efecto antiviral<sup>104</sup>.

## 2.- JUSTIFICACION

El empleo de enterobacterias atenuadas como acarreadores de proteínas heterólogas constituye una alternativa para la administración de antígenos proteicos al sistema inmune. No obstante, existen todavía problemas técnicos que dificultan su desarrollo. Un aspecto fundamental en el éxito de la funcionalidad de los acarreadores bacterianos es la continuidad de la expresión del antígeno *in vivo*, es decir, la persistencia de la proteína recombinante durante la fase de infección del acarreador. La permanencia del plásmido o del gene pasajero no es garantía de la persistencia en la expresión de la proteína heteróloga, esta última, es función del tipo de promotor empleado para dirigir la expresión. Los promotores que son inducibles *in vivo* presentan mayores ventajas que los que se inducen *in vitro*, ya que se inducen de manera natural al paso del acarreador en el hospedero y persiste la producción de la proteína recombinante hasta la eliminación de la bacteria acarreadora, mientras que los que se inducen *in vitro* producen una cantidad de antígeno inicial que luego se agota, pues no continúa su expresión *in vivo*.

Tomando en cuenta la importancia de factores como la estabilidad del gene heterólogo, la persistencia de la expresión del antígeno y la cantidad de proteína recombinante producida, los cuales condicionan el éxito del uso de los acarreadores bacterianos, en este trabajo se propone la construcción de un vector bacteriano el cual combina estas características anteriores, mediante el promotor *pnirB* y del sistema de expresión de proteínas recombinantes del fago T7, integrado en el cromosoma de *Salmonella typhi*. Este sistema presenta diversas ventajas sobre otros sistemas de expresión de proteínas recombinantes sobre todo por la alta selectividad de la T7 RNA polimerasa por su promotor, así como su gran estabilidad comparada con RNA polimerasas de bacterias gram negativas, lo que garantiza la síntesis de suficiente cantidad de proteína de manera selectiva.

### **3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Uno de los factores que influyen en el éxito del uso de los acarreadores bacterianos en la generación de vacunas, es la cantidad y estabilidad del antígeno recombinante producido por la cepa vacunal. Considerando que la expresión de antígenos heterólogos es ineficiente cuando el gene se encuentra integrado en el cromosoma de *Salmonella typhi*, es necesario diseñar un sistema que incremente la producción de la proteína heteróloga y con ello aumentar la disponibilidad del antígeno al sistema inmune.

### **4.- HIPOTESIS**

Si se integra el gene de la T7 RNA polimerasa en una cepa vacunal de *Salmonella typhi* bajo el control del promotor *nirB*, se producirá la T7 RNA polimerasa en bajas concentraciones de oxígeno e iniciará la transcripción de genes reporteros que se encuentren clonados en plásmidos bajo el control del promotor T7. La cantidad de proteína recombinante producida será igual o mayor a la producida por el sistema T7 de *E. coli* BL21(DE3), el cual es uno de los sistemas más fuertes de producción de proteínas recombinantes en bacterias gram negativas.

## 5.- OBJETIVO GENERAL

Construir y evaluar una cepa de *S. typhi* CVD908 que exprese de manera estable e inducible la T7 RNA polimerasa, para la expresión de antígenos recombinantes empleando el sistema de transcomplementación del fago T7.

## 6.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Obtener un plásmido suicida que contenga el gene de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *pnirB*.
- 2.-Integrar el plásmido suicida en la cepa vacunal *S. typhi* CVD908
- 3.-Obtener clonas cointegrantes e integrantes de la cepa vacunal que contengan el gene de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *pnirB* integrado en su cromosoma.
- 4.-Evaluar la expresión de la proteína T7 RNA polimerasa en la cepa vacunal *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-*t7mapol*.
- 5.-Transformar la cepa vacunal *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-*t7mapol* con los plásmidos pIQ-LUC y pIQ- $\beta$ -GAL.
- 6.-Evaluar la transcomplementación de la T7 RNA polimerasa producida por la cepa vacunal, con los genes reporteros luciferasa y  $\beta$ - galactosidasa.

## 7.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 TECNICAS DEL DNA RECOMBINANTE

La preparación del DNA, la manipulación genética, PCR, RT-PCR, Western blot, transformación bacteriana, etc., se realizaron de acuerdo a las especificaciones y protocolos de Sambrook<sup>105</sup>.

### 7.2 REACTIVOS EMPLEADOS EN EL TRABAJO

#### 7.2.1 Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas

Cepas bacterianas	Carateristicas relevantes	Fuente
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>DeoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i>	Colección del Laboratorio
<i>E. coli</i> SY327	Cepa bacteriana que contine el factor <i>pir</i>	Colección del Laboratorio
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> ( rB-mB-) gal $\lambda$ (DE3)	Colección del Laboratorio
<i>S. typhi</i> CVD908	Cepa vacunal mutante en <i>aroC</i> y <i>aroD</i>	Colección del Laboratorio
<i>S. typhi</i> CVD908 $\Delta$ aroC :: <i>sacB-aph</i>	Contiene los genes <i>aph</i> y <i>sacB</i> dentro del locus <i>aroC</i>	Dr. James Galen
<i>S. typhi</i> CVD908 $\Omega$ aroC- <i>t7rnapol</i>	Contiene el gene de la <i>T7pol</i> dentro del locus <i>aroC</i>	Colección del Laboratorio
<i>S. typhi</i> 9,12,Vi:d	Cepa silvestre	Colección del Laboratorio



### 7.2.2 Tabla 2. Plásmidos empleados

Plásmidos	Características relevantes	Fuente
Pbluescript (SK+)	Vector de clonación	Stratagene
PniBr3	Vector derivado de pniBTET15	Chatfiel et al (1992)
PKTN701	Plásmido suicida	Donated by Dr. M. Nishibuchi
PJG12	Plásmido suicida que contiene el cassette <i>aroC-sacB-aroC</i>	Dr. James Galen
PRAZ1	Contiene el gene <i>aph</i> dentro del locus <i>aroC</i>	Este trabajo
PRAZ2	Plásmido suicida que contiene el gene <i>aph</i> dentro del locus <i>aroC</i>	Este trabajo
PRAZ3	Contiene el gene de la <i>T7 pol</i> bajo el promotor <i>nirB</i>	Este trabajo
PRAZ4	Plásmido suicida que contiene el <i>pniRB-T7pol</i> dentro del locus <i>aroC</i> .	Este trabajo
PJRD184	Vector de clonación	Heusterspreute et al (1985)
PIQ	Plásmido derivado de pJRD184 que contiene el promotor <i>T7</i>	Este trabajo
PIQ- $\beta$ -GAL	Contiene el gene <i>lacZ</i> bajo el promotor <i>T7</i>	Este trabajo
PIQ-LUC	Contiene el gene <i>luc</i> bajo el	Este trabajo

	promotor <i>T7</i>	
PCM.V.SPORT- $\beta$ -gal	Contiene el gene <i>lacZ</i> bajo el promotor de <i>CMV</i>	Gibco BRL
PT3/T7-LUC	Contiene el gene <i>luc</i> bajo el promotor <i>lac</i>	Clontech

**7.2.3 Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo**

Nombre	Secuencia	Fuente
T7P-1	ATGAACACGATTAACATCGCTAAG	Gibco BRL
T7P-2	GTTTACGCCGTGTCAATGTTCAAC	Gibco BRL
T7P-3	TTACGCGAACGCGAAGTCCGACTC	Gibco BRL
NIRT7P-1	GGCCCAGGATCCTAATCATCCACAGGAG ACTTT CTGATGAACACGATTAACATCGCTAAGA	Gibco BRL
NIRT7P-2	CCAGGGAAGCTAGCAGATCTTTAC GCGAACGCGAAGTCCGA	Gibco BRL
NIRT7P-3	GGCAATCCGGATCCTTCAGGTAAAT TTGATGTACATCAAAT	Gibco BRL
PT7-1	GCTAATACGACTCACTATAGGGAGAATT CGAGCT	Gibco BRL
PT7-2	ACGTCGATTATGCTGAGTGATATCCCTC TTAAGC	Gibco BRL
PT7LUC-1	CCCGGAAGATCTTAATACGATTCACTAT AGG	Gibco BRL
PT7LUC-2	CCCCTAGCTAGCCTTTTATAGTTACCTATA CC	Gibco BRL

AroC-1	TTCCCAGCTGGAGCTCATGGCAGGAAAC ACAATTGGA	<i>Gibco BRL</i>
AroC-2	TTCCCAGCTGGAGCTCTTACCAGCGTGG AATCTCTGT	<i>Gibco BRL</i>
AroC-3	GGGTATCGTTCGATGGCGTGC	<i>Gibco BRL</i>
AroD-1	ATGAAAACCGTCACCGTAAA	<i>Gibco BRL</i>
AroD-2	TCAGGCGTTGTGCAGAATCA	<i>Gibco BRL</i>

### 7.3.- CARACTERIZACION DE CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas *E. coli* BL21(DE3) y *S. typhi* CVD908ΔaroC::sacB-aph fueron caracterizadas antes de su empleo. *E. coli* BL21(DE3) fue caracterizada por PCR, para lo cual se resuspendió una colonia de la cepa en 50 μl de agua inyectable, se hirvió por 10 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. Se usaron 10 μl de sobrenadante para amplificar por PCR la forma truncada del gene de la T7 RNA polimerasa con los iniciadores T7P-2 y T7P-3, el fragmento amplificado tiene un tamaño de 1376 pb. La cepa *S. typhi* CVD908ΔaroC::sacB-aph tiene integrado en el locus *aroC* los genes *sacB* y *aph*, el primero codifica para una levusocrasa, la cual confiere susceptibilidad a la cepa bacteriana a sacarosa, y el segundo gene codifica para una aminoglicósido fosfotransferasa, que confiere resistencia a kanamicina. Por tanto, la cepa *S. typhi* CVD908ΔaroC::sacB-aph presenta el fenotipo Km<sup>r</sup>, Cml<sup>r</sup>, sucrose<sup>s</sup>, al inocular la cepa bacteriana de forma independiente en cajas de LB con sacarosa al 10%, Cloranfenicol ó Kanamicina.

#### 7.4.-CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS

Las bacterias empleadas y generadas en este trabajo se muestran detalladamente en la **tabla 1**. Las cepas fueron crecidas en medio Luria broth (LB, Gibco), conteniendo el antibiótico correspondiente en las concentraciones de 100 µg ampicilina /ml (Ap; Sigma, St. Louis, MO); 25 µg Kanamicina/ml (Km; Sigma); 50 µg cloranfenicol/ml (Sigma).

Las cepas vacuales de *S. typhi* fueron crecidas en medio LB en presencia de 0.01%(w/v) p-hidroxibenzoato (DHB, Sigma). La inducción bacteriana en condiciones de anaerobiosis se realizó creciendo una semilla hasta la fase logarítmica ( $Abs_{600nm}=1.0$ ), e inoculando tubos de 50 ml con 100 µl del inóculo bacteriano en medio tioglicolato 2x (Difco) hasta 1.0, D.O a 600 nm. La cepa vacunal cointegrante fue curada en medio LB con DHB y sacarosa al 10%. La selección de cepas integrantes se realizó en cajas de medio LB con DHB y el correspondiente antibiótico o sacarosa al 10%.

#### 7.5.- CONSTRUCCION DE LA CEPA *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-*t7rnapol*.

Los plásmidos empleados y contruidos, así como la secuencia de los iniciadores se describen en la **tabla 2 y 3** respectivamente. La cepa vacunal *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-*t7rnapol* fue obtenida mediante la integración de la T7 RNA polimerasa en el locus *aroC*, para lo cual se requirió de la construcción del plásmido suicida pRAZ4, el cual contiene el gene de la T7 RNA polimerasa delimitado por segmentos parciales de la secuencia de *aroC*. Los segmentos parciales de *aroC* delimitan al gene de la polimerasa recombinante con las secuencias homólogas que se localizan en el cromosoma de la cepa vacunal *S. typhi* CVD908 $\Delta$ aroC::*sacB-aph* (amablemente donado por el Dr. James Galen, Center for Development, University of Maryland at Baltimore, USA), permitiendo la integración por recombinación homóloga. A partir del plásmido pJG12

se obtuvo el fragmento *aroC-aph-aroC*, para posteriormente insertarlo en pBluescript (Clontech), dando origen al plásmido pRAZ1. El plásmido pRAZ1 fue cortado con SacI/KpnI, obteniendo el fragmento *aroC-aph*, que posteriormente se insertó en el plásmido suicida pKTN701, previamente digerido con las enzimas SacI/KpnI, dando origen a plásmido pRAZ2. Se amplificó el gene de la T7 RNA polimerasa a partir de DNA genómico de *E. coli* BL21(DE3) usando los iniciadores NIRT7P-1 y NIRT7P-2, el producto de PCR se insertó en el plásmido pNir3, generando el plásmido pRAZ3. Se uso el plásmido pRAZ3 como templado para amplificar *nirB*-T7RNA polimerasa con los iniciadores NIRT7P-2 y NIRT7P-3, el fragmento se insertó en el plásmido suicida pRAZ2 en los sitios NheI/BglII, obteniéndose el plásmido denominado pRAZ4. El plásmido pRAZ4 se purificó y se electroporó en bacterias electrocompetentes de *S. typhi* CVD908ΔaroC::*sacB-aph* (Km<sup>r</sup>, Cml<sup>s</sup>, sucrose<sup>s</sup>). Las condiciones de electroporación empleadas fueron 2500 volt, 0.025 μF, 0.201 Ohm, 0.005 mseg. La cepa electroporada fue plaqueada en cajas que contenían cloranfenicol y kanamicina, lo que permite la selección de bacterias que se encuentran en el estadio de cointegración.

Las bacterias cointegrantes (Km<sup>r</sup>, Cml<sup>s</sup>, sucrose<sup>s</sup>) fueron crecidas en sacarosa al 10% por 16 hrs (Gay *et al.* 1985), condiciones que favorecen un segundo proceso de recombinación homóloga. Las cepas integrantes de *S. typhi* CVD908ΩaroC-*t7mapol* (Km<sup>s</sup>,Cml<sup>s</sup>, sucrose<sup>r</sup>) se realizó en cajas independientes con sacarosa al 10%, cloranfenicol y kanamicina. Para más detalle del proceso de recombinación ver la **figura 3**.

## **7.6 CARACTERIZACION GENOTIPICA DE LA CEPA *S. typhi* CVD908ΩaroC-*T7mapol*.**

Las cepa integrante de *S. typhi* CVD908ΩaroC-*T7mapol*, después de ser seleccionada por el fenotipo en cajas de medio LB con el respectivo antibiótico y sacarosa al 10%, se caracterizó por PCR. Se resuspendió una colonia de la cepa vacunal en 50 μl de agua inyectable, se hirvió por 10 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. Se

usaron 10 µl de sobrenadante para amplificar por PCR diferentes regiones del gene de la T7 RNA polimerasa y *aroC*. Los iniciadores empleados para amplificar el gene de la T7 RNA polimerasa fueron T7P-1, T7P-2 y T7P-3. La combinación de los iniciadores T7P-1- T7P-3 amplifican un fragmento de 2684 pb que corresponde al gene completo de la T7 RNA polimerasa, mientras que la combinación T7P-2-T7P-3 permite la amplificación de una forma truncada del gene de la T7 RNA polimerasa de 1376 pb. El locus *aroC* que contiene insertado el gene de la T7-RNAPolimerasa fue amplificado con los oligos AroC-1 y AroC-2 , obteniendose un fragmento de aproximadamente 3200 pb.

#### **7.7 SECUENCIACION DEL locus *aroC* EN LA CEPA INTEGRANTE *S. typhi* CVD908Ω*aroC*-*T7mopol***

El gene de la T7 RNA polimerasa fue amplificado empleando los iniciadores AroC-1 y AroC-2 a partir del DNA cromosomal de la cepa integrante *S. typhi* CVD908Ω*aroC*-*T7mopol* (GeneAmp(R)PCR System 2400, Perkin-Elmer, Co.). El producto de la amplificación fue secuenciado con el kit DNA Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), empleando 500 ng del producto de amplificación y 8pM del primer AroC3, el cual esta localizado en locus *aroC* a 100 bp antes del final de la T7 RNA polimerasa. La amplificación fue purificada con columnas CENTRISEP (Applied Biosystems).

#### **7.8 OBTENCION DE LOS PLASMIDOS REPORTEROS Y TRANSFORMACION DE LA CEPA *S. typhi* CVD908Ω*aroC*-*T7mopol* Y *E. coli* BL21(DE3).**

Los oligos sintéticos del promotor T7 denominados PT7-1-PT7-2, fueron insertados en el plásmido pJRD184 en los sitios PstI/SacI (al plásmido pJRD184 previamente se le eliminó un sitio EcoRI que interfería con la estrategia de clonación), para obtener el

plásmido pIQ, el cual fué cortado con EcoRI. El gene de la Luciferasa (*luc*) se obtuvo del plásmido pT3/T7-LUC (Clontech, GenBank U02437), digiriendo con EcoRI. Se ligó el plásmido pIQ con el gene de la luciferasa generando el plásmido pIQ-LUC. Para obtener el sistema reportero de  $\beta$ -galactosidasa, el plásmido pCMV-SPORT- $\beta$ gal (Gibco BRL) fue digerido con EcoRI/BamHI dando origen al gene de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*), el gene fue clonado en el vector pIQ, el cual previamente se cortó con las enzimas EcoRI/BamHI. El plásmido resultante se denominó pIQ- $\beta$ -GAL. Los plásmidos pIQ-LUC y pIQ- $\beta$ -GAL fueron purificados de *E.coli* y eletroporados en bacterias electrocompetentes de *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol y *E. coli* BL21(DE3).

## **7.9 EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA T7 RNA POLIMERASA EN *E. coli* SY327.**

Se evaluó la expresión de la polimerasa recombinante en cepas de *E. coli* SY327 que contenían el gene de la T7 RNA polimerasa en el plásmido suicida pRAZA. Se indujeron las cepas de *E. coli* SY327 en anaerobiosis y se determinó la cantidad de bacteria a 600 nm. Se obtuvo una pastilla bacteriana correspondiente a  $1 \times 10^8$ , la cual fue resuspendida en buffer muestra (50mM Tris-HCL pH 6.8, 100 mM ditiotreitól, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenól y 10% de gliceról). Se corrieron  $2 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  bacterias en geles de acrilamida al 12.5% en condiciones reductoras.

## **7.10 EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA T7 RNA POLIMERASA INTEGRADA EN EL CROMOSOMA DE *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol.**

La producción de RNA mensajero de la T7 RNA polimerasa por la cepa integrante *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol y *E. coli* BL21(DE3) fue evaluado por RT-PCR.

A  $1 \times 10^9$  bacterias, se les adicionó 500  $\mu$ l de TRIzol® (GIBCO, BRL), se homogenizó la suspensión bacteriana y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, se adicionaron 100  $\mu$ l de cloroformo a la mezcla bacteriana y se centrifugó a 4 °C por 15

minutos. Se separó la fase orgánica, y se precipitó el RNA total. El RNA total se cuantificó y se colocó 5µg de RNA para una reacción de RT-PCR, para este propósito se empleó la retrotranscriptasa reversa amv (Boehringer Mannheim). El cDNA obtenido fue sometido a una reacción de PCR donde se emplearon los oligos T7P-2 y T7P-3. El fragmento amplificado corresponde a una forma truncada del gene de la T7 RNA polimerasa de 1376 pb. Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio bajo luz UV.

### **7.11 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA**

De cepas bacterianas frescas, se inocularon 5ml de medio BHI, hasta una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, de este cultivo se tomaron 100 µl de bacteria y se inocularon 50ml de medio 2x de tioglicolato. Las bacterias fueron sonicadas y cuantificadas por el método de Bradford, 50 µg de proteínas se colocaron en una placa de 96 pozos para determinar la actividad de la luciferasa (Promega E4030). A cada pozo de muestra se le adicionó 100 µl de buffer de ensayo de la luciferasa, el cual contiene el substrato luciferina y ATP. Inmediatamente se determinó la emisión máxima de luz en un luminómetro (Lab-System, Luminoscan).

### **7.12 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE β-GALACTOSIDASA**

Se inocularon 5ml de medio BHI con la cepa correspondiente, la semilla bacteriana se creció hasta una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. A 50ml de medio 2x de tioglicolato se le adicionaron 100 µl de la semilla bacteriana y se crecieron por 16 horas. Las bacterias inducidas se cosecharon y lavaron con solución salina. La pastilla bacteriana fue sonicada y cuantificada por el método de Bradford. 50 µg de proteínas de bacterias sonicadas fueron colocadas en placas de ELISA en un volumen de 50 µl, se adicionaron 50 µl de Assay 2x buffer (Promega E2000) y después de 10 minutos se realizó la lectura de densidad óptica a 420 nm.



## 8.- RESULTADOS

### 8.1 CARACTERIZACION DE LAS CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS

La cepa *E. coli* BL21(DE3) fue caracterizada por PCR, empleando los iniciadores T7P1, T7P-2 Y T7P-3. La combinación de los iniciadores T7P1 y T7P3 dan un producto de ~2700 pb, el cual corresponde al gene completo de la T7 RNA pol. La combinación de los iniciadores T7P2 y T7P3 amplifican un producto de 1376 pb y corresponde a una fragmento parcial del gene de la T7 RNA polimerasa (**figura 4**), lo cual confirma la identidad de la cepa bacteriana. La cepa bacteriana caracterizada por PCR fue usada en la evaluación de los plásmidos reporteros pIQ-LUC y pIQ-β-gal, así como en la obtención del gene de la T7 RNA polimerasa que fue insertado en el cromosoma de *S. typhi* CVD908. La cepa vacunal *S. typhi* CVD908 fue caracterizada por PCR empleando los oligonucleótidos aroC-1, aroC-2, aroD-1 y aroD-2. En la **figura 2B**, se muestran los productos de la amplificación que corresponden a las formas truncadas de estos genes, responsables de la auxotrofia a aminoácidos aromáticos por la cepa vacunal, según se muestra en el esquema de la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos en *Salmonella* (**figura 2A**).

La cepa CVD908ΔaroC::sacB-aph presentó el fenotipo Km<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, sacarosa<sup>s</sup><sup>1</sup>, la cual fue evaluada creciendo la cepa en cajas de agar LB con los antibióticos respectivos o en presencia de 10% de sacarosa (**figura 5**). La cepa *S. typhi* CVD908 ΔaroC::sacB-aph caracterizada fenotípicamente, fue empleada para la integración del gene de la T7 RNA polimerasa en el locus *aroC* por recombinación homóloga.

### 8.2 OBTENCION DE LA CEPA *S. typhi* CVD908ΔaroC-T7mapol.

El plásmido suicida pRAZ4, se obtuvo por una serie de pasos de clonación que se ilustran en la **figura 6**. El plásmido suicida pKTN701, el cual fue empleado en la

construcción del plásmido pRAZ4 fue caracterizado con enzimas de restricción previamente a su uso generando el patrón de restricción esperado ( **figura 7**). El gene de la T7 RNA polimerasa empleado en la generación del plásmido pRAZ3 se obtuvo a partir de DNA genómico de la cepa *E. coli* BL21(DE3), empleado los iniciadores NIRT7P-1 y NIRT7P-2, amplificando el gene completo de la T7 RNA polimerasa, con el tamaño correspondiente de 2.7 kb (**figura 8**). El plásmido pRAZ3 fue empleado como templado para una segunda amplificación del gene de la T7 RNA polimerasa con el promotor *nirB* y la secuencia de unión al ribosoma, el nuevo fragmento de PCR obtenido se empleó en la generación del plásmido pRAZ4. El plásmido suicida pRAZ4 se verificó con enzimas de restricción (datos no mostrados) y por PCR, empleando los iniciadores AroC-1, AroC-2, T7P-1 y T7P-2 (**figura 9**). El resultado de PCR demuestra que el plásmido suicida pRAZ4 contiene el cassette aroC-T7pol, lo cual corresponde a un producto de PCR de 3.2 Kb, además de amplificar también el gene completo de la T7 RNAPol con los iniciadores respectivos.

El plásmido pRAZ4 fue purificado a partir de *E. coli* SY327 y fue electroporado en *S. typhi* CVD908 $\Delta$ aroC::*sacB-aph*, las bacterias electroporadas fueron sembradas en cajas con cloranfenicol y kanamicina, las bacterias cointegrantes tienen el fenotipo Km<sup>r</sup>, Cml<sup>r</sup>, sacarosa<sup>s</sup> (**figura 10**). Una clona cointegrante fue seleccionada y curada, creciendo la cepa por 16 hr en presencia de sacarosa al 10% y plaqueando posteriormente en cajas sin antibiótico en presencia de DHB, en diferentes diluciones, en la **figura 11A** se muestra una serie de diluciones realizadas para obtener colonias independientes, que llevaron a cabo la segunda recombinación, las clonas fueron posteriormente seleccionadas por su fenotipo de resistencia a sacarosa al 10%, y sensibilidad a kanamicina y cloranfenicol. En la **figura 11B** se muestra el patrón de resistencia a Km, Cml y sacarosa de 100 colonias independientes, donde se demuestra que el 100% de las clonas perdieron el gene de sensibilidad a la sacarosa, aproximadamente el 98% fueron sensibles a kanamicina por pérdida del gene *aphI*, mientras que el 75% de las clonas fueron

sensibles a cloranfenicol, lo cual indica la desinserción del plásmido suicida del genoma de *S. typhi* CVD908. Las clonas que fueron Km<sup>r</sup>, Cml<sup>r</sup>, sacarosa<sup>r</sup> se seleccionaron para su posterior análisis por PCR (figura 11C).

Las cepas *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol (Km<sup>r</sup>, Cml<sup>r</sup>, sacarosa<sup>r</sup>), se analizaron por PCR, los iniciadores empleados para amplificar el gene completo de la T7 RNA polimerasa fueron T7P-1 y T7P-3, generando un fragmento de 2684 pb, y para amplificar la forma truncada se emplearon los iniciadores T7P-2 y T7P-3, el producto obtenido corresponde a la forma truncada del gene de la T7 RNA polimerasa de 1376 pb. Con los iniciadores AroC-1 y AroC-2 se amplificó una banda de aproximadamente 3200 pb correspondiente al casete *aroC*-T7rnapol, el cual contiene el gene de la T7 RNA polimerasa bajo el promotor *pnirB*. Como controles del experimento se realizaron ampliificaciones del DNA genómico de *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* 9, 12, Vi:d, con las combinaciones de iniciadores mencionadas con anterioridad. En la figura 12 se muestra el resultado de una clona de *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol que da un producto de ampliificación el gene de la T7 RNA polimerasa parcial y de forma completa, mientras que *S. typhi* CVD908 fue negativa a la ampliificación de la polimerasa de forma parcial o completa. La ampliificación para el fragmento *aroC*, demuestra que la *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol contiene integrado dentro del locus *aroC* el gene de la T7 RNA polimerasa, mientras que *S. typhi* CVD908 amplifica el locus *aroC* truncado con un tamaño de 400 pb, por otra parte, *S. typhi* 9, 12, Vi:d muestra el fragmento del gene *aroC* silvestre de aproximadamente 1110 pb.

### 8.3 SECUENCIACION DEL SITIO DE INTEGRACIÓN DEL GEN DE LA T7 RNA POLIMERASA EN *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol

A partir de la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol se obtuvo DNA genómico, el cual se empleo para la ampliificación del locus *aroC* con los iniciadores aroC-1 y aroC-2. Posteriormente se empleo como templado el producto de PCR obtenido, y mediante el

uso del iniciador *aroC3* se realizó el proceso de secuenciación del extremo 5' del *locus aroC*, para poner de manifiesto el sitio exacto de integración del gene de la T7 RNA polimerasa en el genoma de *S. typhi* CVD908 $\Delta$ *aroC-T7mapol*. Como se puede observar en la **figura 13**, el gene de la T7 RNA polimerasa fue integrado aproximadamente a 150 pares de bases del inicio del gene *aroC* en orientación negativa con respecto al promotor de *aroC*.

#### **8.4 EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA T7 RNA POLIMERASA.**

Todas las construcciones que contiene el gene de la T7 RNA polimerasa bajo el promotor *nirB* fueron evaluadas después de su construcción. El primer plásmido obtenido con el gene de la polimerasa fue pRAZ3, este plásmido fue transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$  y se evaluó su expresión en geles de acrilamida al 12.5% en condiciones reductoras. En la **figura 14** se muestran diferentes concentraciones de bacteria donde se observa claramente la presencia de una banda correspondiente a la T7 RNA polimerasa recombinante de aproximadamente 107 kDa. El plásmido suicida pRAZ4 fue transformado en *E. coli* SY327 y diferentes clonas fueron seleccionadas y crecidas en medio luria con cloranfenicol hasta la fase logarítmica,  $4 \times 10^6$  bacterias fueron corridas en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12.5%, demostrando la expresión de la proteína recombinante de 107 kDa (**figura 15**). El plásmido suicida RAZ4 fue purificado de una clona de *E. coli* SY327 positiva para la expresión de la T7 RNA polimerasa, y fue electroporado en bacterias electrocompetentes de *S. typhi*  $\Delta$ *aroC::sacB-aph*, las bacterias fueron seleccionadas como se mencionó con anterioridad y las clonas integrantes del gene de la T7 RNA polimerasa demostrado por su fenotipo y genotipo, fueron preparadas para correr proteínas totales en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12.5%, sin embargo, no se detectó a simple vista la proteína correspondiente a la polimerasa, la cual es de 107 kDa. Esto puede deberse a su baja expresión, ya que únicamente se integró una sola copia del gene en el genoma bacteriano (**figura 16**).

En carencia de anticuerpos específicos para la T7 RNA polimerasa se procedió a evaluar la expresión de RNA mensajero por medio de RT-PCR. Se obtuvo RNA total a partir de *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol inducida en anaerobiosis y *E. coli* BL21(DE3) inducida con IPTG. El RNA total fue cuantificado y se realizó un RT-PCR en presencia y ausencia de la enzima transcriptasa reversa. Los resultados del experimento muestran amplificación de la forma truncada de la T7 RNA polimerasa con los oligos T7P-2 y T7P-3 en presencia de transcriptasa reversa, pero no se ve amplificación alguna en ambas cepas inducidas cuando hay ausencia de la transcriptasa reversa, lo cual demuestra que es una amplificación específica del RNA mensajero y no por contaminación con DNA genómico de las cepas bacterianas (figura 17). Este resultado demuestra que la cepa de *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol está produciendo RNA mensajero para la T7 RNA polimerasa, y que la concentración de la proteína producida es baja que no permite su detección a simple vista en geles SDS-PAGE 12.5%.

### **8.5 OBTENCION DE LOS GENES REPORTEROS BAJO EL PROMOTOR T7.**

Se sintetizaron oligonucleótidos conteniendo la región del promotor T7, el cual fue insertado en el plásmido pJRD184, obteniéndose la clona denominada pIQ. En el sitio EcoRI del plásmido pIQ se insertó el gene de la luciferasa. El plásmido obtenido se denominó pIQ-LUC y fue digerido con diferentes enzimas de restricción para verificar su identidad (figura 18). De manera similar se insertó en el plásmido pIQ el gene de la  $\beta$ -galactosidasa, obteniéndose el plásmido pIQ- $\beta$ -GAL (datos no mostrados). Los plásmidos reporteros fueron purificados a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$  y electroporados en bacterias electrocompetentes de *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7rnapol , para evaluar la funcionalidad de la T7 RNA polimerasa recombinante.

## **8.6 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA EN EL SISTEMA DE COMPLEMENTACION.**

Se evaluó la capacidad de la polimerasa de unirse al promotor T7 y transcribir genes que dan origen a las proteínas reporteras luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. La cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $\eta$ apol fue transformada con los plásmidos pIQ-LUC y pIQ- $\beta$ -GAL de manera independiente, y se evaluó la producción del gene reportero mediante la cuantificación de fotones emitidos en un ensayo de degradación de la luciferina por la luciferasa, y la hidrólisis de ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) por la  $\beta$ -galactosidasa, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En la **figura 19** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de luciferasa, los cuales muestran la producción de la polimerasa solo en condiciones de anaerobiosis, y su complementación con el gene reportero bajo el promotor pT7. De forma paralela se uso como estándar de comparación a la cepa comercial *E. coli* BL21(DE3), la cual expresa la polimerasa cuando se induce en presencia de IPTG. Comparando la expresión en *E. coli* BL21(DE3) y *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $\eta$ apol no se demuestran diferencias significativas en los niveles de actividad de degradación de los sustratos por las proteínas reporteras, lo cual indica que la cantidad de polimerasa producida por la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $\eta$ apol es comparable a la cantidad producida por la cepa comercial *E. coli* BL21(D3).

## **8.7 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA EN EL SISTEMA DE COMPLEMENTACION**

Se indujo la expresión de la T7 RNA polimerasa en anaerobiosis en la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $\eta$ apol, y se evaluó su complementación con el promotor T7. El promotor T7 controla la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa. La evaluación de la  $\beta$ -galactosidasa se realizó colocando en una placa de 96 pozos, 50  $\mu$ g de proteínas totales

de bacterias inducidas y 50  $\mu$ l de buffer de ensayo 2x, el cual contiene el sustrato ONPG. Despues de 10 minutos se cuantifico la densidad óptica en un lector de ELISA a 420nm. Los resultados demuestran la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa solo en las clonas *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-*T7rnapol* que fueron inducidas en condiciones de anaerobiosis (**figura 20**).

## 9.- DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Una de las estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas consiste en el empleo de cepas atenuadas bacterianas como acarreadores de antígenos heterólogos. Para este fin, se han generado cepas atenuadas de *Mycobacterium* (BCG), *Listeria monocytogenes*, *Salmonellae* y *Shigellae*, las cuales han sido evaluadas en modelos murinos y por pruebas preliminares en humanos.

Por otra parte, se han empleado también una gran variedad de sistemas de expresión de proteínas recombinantes que pueden ser clasificados en dos grupos: los que se expresan a partir de plásmidos de expresión y los que son expresados a partir de genes integrados en el cromosoma bacteriano. En general, a partir de plásmidos de expresión se han obtenido grandes cantidades de la proteína recombinante, dependiendo principalmente del promotor y del número de copias del plásmido. Sin embargo, las bacterias tienden a perder rápidamente estos plásmidos en ausencia de la presión selectiva de antibióticos u otros marcadores de selección. Por otra parte, la expresión de genes heterólogos desde el cromosoma bacteriano es más estable, además de no requerir de algún marcador de selección, pero la cantidad de proteína recombinante producida es mucho menor, debido principalmente a la presencia de una sola copia del gene heterólogo en el cromosoma.

El sistema de expresión del fago T7 consiste de dos elementos, la proteína T7 RNA polimerasa y el promotor T7. La T7 RNA polimerasa, es codificada por un gene de 2.7 Kb, es una proteína monomérica de 107 kDa y con una gran especificidad a su promotor. Su velocidad de transcripción es cinco veces más rápida comparada a las RNA polimerasas bacterianas. El promotor T7 es de estructura simple con una secuencia de solamente 23 pb<sup>106</sup>. Estos dos elementos pueden ser manipulados fácilmente para obtener gran cantidad de RNA mensajero y con ello, gran cantidad de



proteína recombinante, tanto en organismos procarióticos como eucarióticos. Este sistema binario ha sido empleado en muchas áreas, tales como microbiología, virología, biología celular e ingeniería genética. En lo que respecta al campo de la vacunología, este sistema ha sido empleado para producir y purificar una gran variedad de proteínas antigénicas y RNAs para la inmunización genética.

Más recientemente se ha empleado el sistema T7 para la expresión de proteínas pasajeras en vectores virales y bacterianos. Por ejemplo, en la bacteria gram positiva *Lactococcus lactis* se indujo una expresión elevada del fragmento C de la toxina del tétanos bajo este sistema, cuya inmunización en un modelo murino, indujo protección al reto con la cepa silvestre productora de la toxina, y que constituyó una alternativa prometedora en el desarrollo de vacunas para la inducción de inmunidad en mucosas<sup>86</sup>.

El gene de la T7 RNA polimera ha sido integrado también en el cromosoma de la cepa atenuada *S. typhimurium* SL3261, y transcomplementado con un plásmido codificando la proteína superóxido dimutasa del parásito *Acanthocheilium viteae*. Se reportó que los plásmidos fueron estables aún en la ausencia de antibióticos, y la bacteria recombinante indujo una respuesta fuerte de anticuerpos contra el parásito en roedores<sup>107</sup>.

En el presente trabajo doctoral, se muestran los resultados obtenidos al integrar la T7 RNA polimerasa en el cromosoma de la cepa vacunal *Salmonella typhi* CVD908, para generar la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-*T7rnapol*, y su transcomplementación con plásmidos que codifican genes reporteros bajo el control del promotor T7. El sistema T7 RNA polimerasa/ promotor T7 funcionó eficientemente en *S. typhi*, el cual fue confirmado por la producción de dos proteínas reporteras, luciferasa y la  $\beta$ -galactosidasa (figuras 19 y 20 ). La expresión de la T7 RNA polimerasa en esta cepa

fue estable sin el requerimiento de antibióticos u otros marcadores de selección y lo más importante es que fue inducible, ya que estuvo regulado por el promotor *pnirB*, el cual es un promotor que se induce *in vivo* a concentraciones bajas de oxígeno, esto fue demostrado por la expresión de la luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa solamente en condiciones de cultivo en anaerobiosis (Figure 19 y 20). El sistema del bacteriófago T7 RNA pol/promotor T7 es altamente específico en la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $rnapol$ , ya que no se observó expresión alguna de los genes reporteros en las cepas de *S. typhi* CVD908 que carecieron del sistema T7, y que fueron transformadas con los plásmidos pIQ-LUC o pIQ- $\beta$ -GAL. Así también, la actividad residual obtenida entre las cepas que carecen del sistema T7, comparada con la cepas *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $rnapol$  carentes de los plásmidos reporteros no fue significativamente diferente.

Otro punto importante observado en este trabajo es que la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroC-T7 $rnapol$ , tuvo un nivel de expresión de las proteínas reporteras de manera comparable a la cepa *E. coli* BL21(D3), la cual es una cepa ampliamente usada a nivel mundial en la producción de proteínas recombinantes, aunque en esta cepa la T7 RNA polimerasa esta controlada por el promotor placUV5.

La importancia de la regulación del sistema T7 por el promotor *pnirB* en la cepa vacunal *Salmonella typhi* CVD908, es que su inducción inicia cuando la bacteria pasa a través del tracto digestivo seguido de su acceso a ambientes microaerofilicos, posteriormente se puede producir gran cantidad de proteína pasajera cuando la bacteria sea tomada por los macrófagos, ya que su residencia en estas células es en el entorno fagosomal, iniciandose una eficiente presentación del antígeno al sistema inmune. El promotor *pnirB* ha sido ampliamente usado para dirigir la expresión de proteínas antigénicas heterólogas en acarreadores bacterianos,<sup>71</sup> y se le ha observado ventajas sobre otros promotores principalmente sobre aquellos que se inducen *in vitro*, puesto

que los promotores inducibles *in vivo* se activan de manera natural al paso del acarreador en el hospedero y la actividad persistirá hasta la eliminación de la bacteria acarreadora, mientras que los que se inducen *in vitro* producirán una cantidad de antígeno inicial que luego se agotará, pues no continua su expresión *in vivo*.

Hasta el momento los resultados presentados en este trabajo se limitan a experimentos *in vitro*, pero la característica de infectar a células presentadoras de antígenos profesionales por *Salmonella*, hace interesante probar a corto plazo esta nueva construcción en un modelo murino con antígenos relevantes expresados bajo el sistema T7, y comparar los resultados con los obtenidos empleando otros sistemas de expresión, y así conocer también la relevancia del sistema T7, *in vivo*.

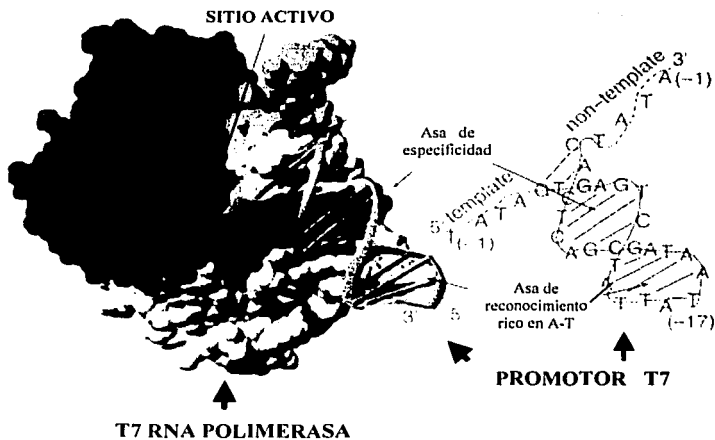
Finalmente, la construcción de la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7 $\rho$ mapol abre la posibilidad de intentar nuevas construcciones en donde se integre también el promotor T7 controlando el gene de interés en "tandem", y de esta manera comparar la eficiencia de la producción del antígeno con los sistemas en plásmidos.

---

# **10.- SECCION DE FIGURAS**

# FIGURA 1

## INTERACCION DE LA T7 RNA POLIMERASA CON EL PROMOTOR T7



### Representación esquemática de la estructura del complejo T7RNAPol-promotor T7.

En la figura de arriba, se muestran los diferentes dominios de la T7RNA polimerasa. Amarillo, dominio encargado del reconocimiento y desnaturalización del promotor T7.

Verde, dominio de anclaje al promotor llamado el "pulgar" (Thumb) de la enzima. Azul, dominio de anclaje y estabilización al promotor llamado "dedos" (fingers) de la enzima.

Rojo, dominio que forma el surco de la enzima (sitio activo polimerizante) por donde se aloja el promotor T7, también llamado la "palma" de la enzima (palm).

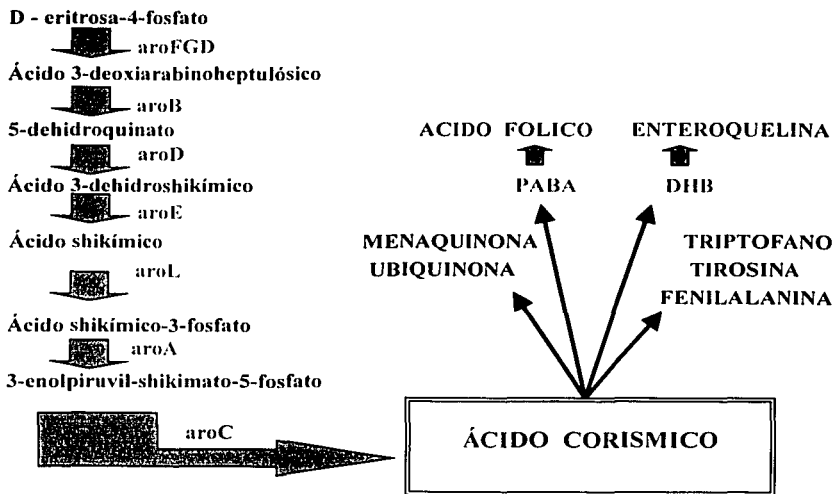
Las hebras templado y no templado del promotor T7 se muestran en gris y morado, respectivamente. Se muestra la secuencia del promotor T7 involucrada en el reconocimiento por la T7 RNAPol.

Este esquema fue obtenido de la estructura cristalográfica a 2.4 Å de resolución del complejo T7 RNAPol con un fragmento de 17 pb del promotor T7. Graham M.T., et. al. *Nature*, 399:80-83.

## FIGURA-2

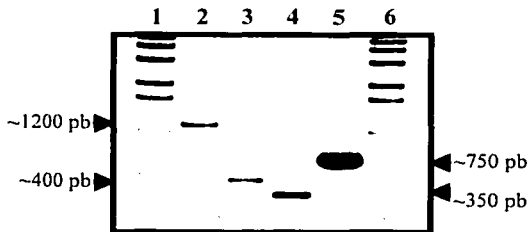
A

### ESQUEMA DE LA RUTA METABOLICA DE LA BIOSINTESIS AROMATICA EN *Salmonella*.



B

### CARACTERIZACION DE LA CEPA *Salmonella typhi* CVD908 POR PCR



Amplificación de los genes *aroC* y *aroD* de *Salmonella typhi* CVD908 y *Salmonella typhi* Ty2 por PCR.

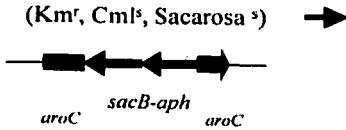
1.- Pesos Moleculares de 1 Kb. 2.- Producto de PCR del gen *aroC* silvestre (Ty2), 3.- gen *aroC* incompleto de la cepa vacunal (CVD908), 4.- Gen *aroD* incompleto de la cepa vacunal. 5.- Gen *aroD* silvestre.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

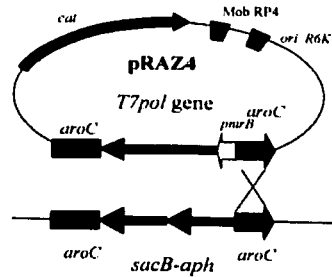
# FIGURA 3

Representación esquemática de los diferentes estadios en el proceso de recombinación homóloga

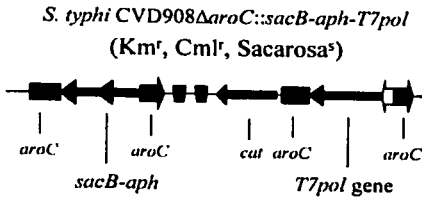
## A. CEPA PARENTAL



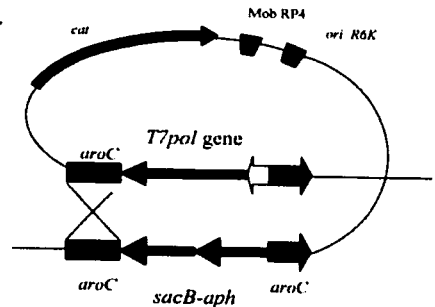
## B. PRIMERA RECOMBINACION



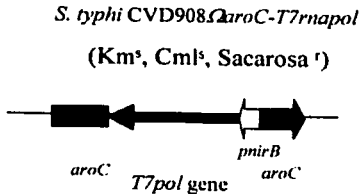
## C. CEPA COINTEGRANTE



## D. SEGUNDA RECOMBINACION



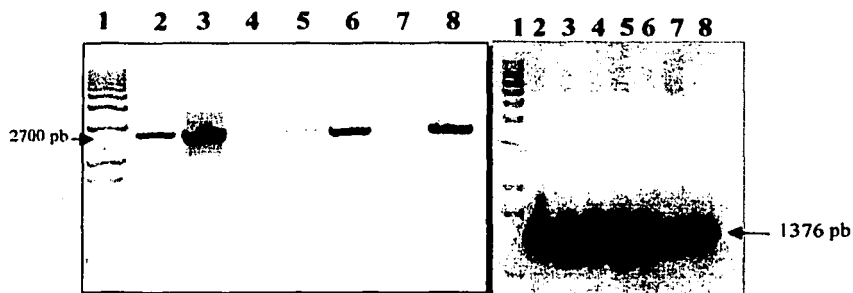
## E. CEPA INTEGRANTE



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 4

### CARACTERIZACION DE *E. coli* BL21(DE3) POR PCR.



#### PANEL A

1.- Pesos Moleculares 1Kb. 2,3, 5,6 y 8.- Clonas individuales de *E. coli* BL21(D3). 4,7.- Clonas individuales de *E.coli* DH5 $\alpha$ .. Iniciadores T7P1 y T7P3

#### PANEL B

1.- Pesos Moleculares 1Kb. 2 a 8.- Clonas individuales de *E. coli* BL21(DE3). Iniciadores T7P1 y T7P2.

Mediante un ensayo de PCR se amplificó el gen de la T7 RNA polimerasa a partir de clonas individuales de *E. coli*, empleando diferentes juegos de iniciadores.

Todas las clonas verificadas amplifican el fragmento 2700 pb que corresponde al gen completo, y el fragmento de 1376 pb, que corresponde para una forma truncada del gen de la T7 RNA polimerasa, indicando la identidad de *E. coli* (BL21(DE3)), la cual tiene integrado en su genoma el gen de la T7 RNA polimerasa.

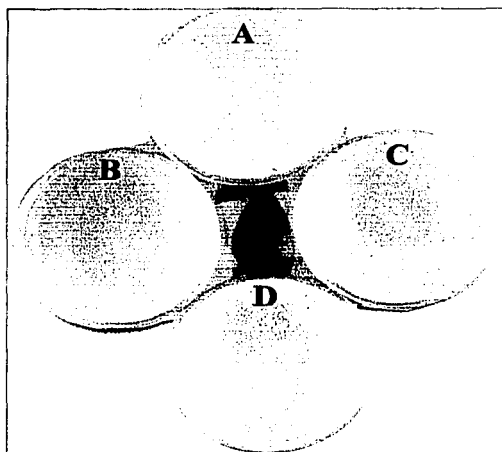
TESTS CON  
FALSA DE ORIGEN



## FIGURA 5

### CARACTERIZACION DE *S. typhi* CVD908 $\Delta$ aroC::*sacB*-*aphI*

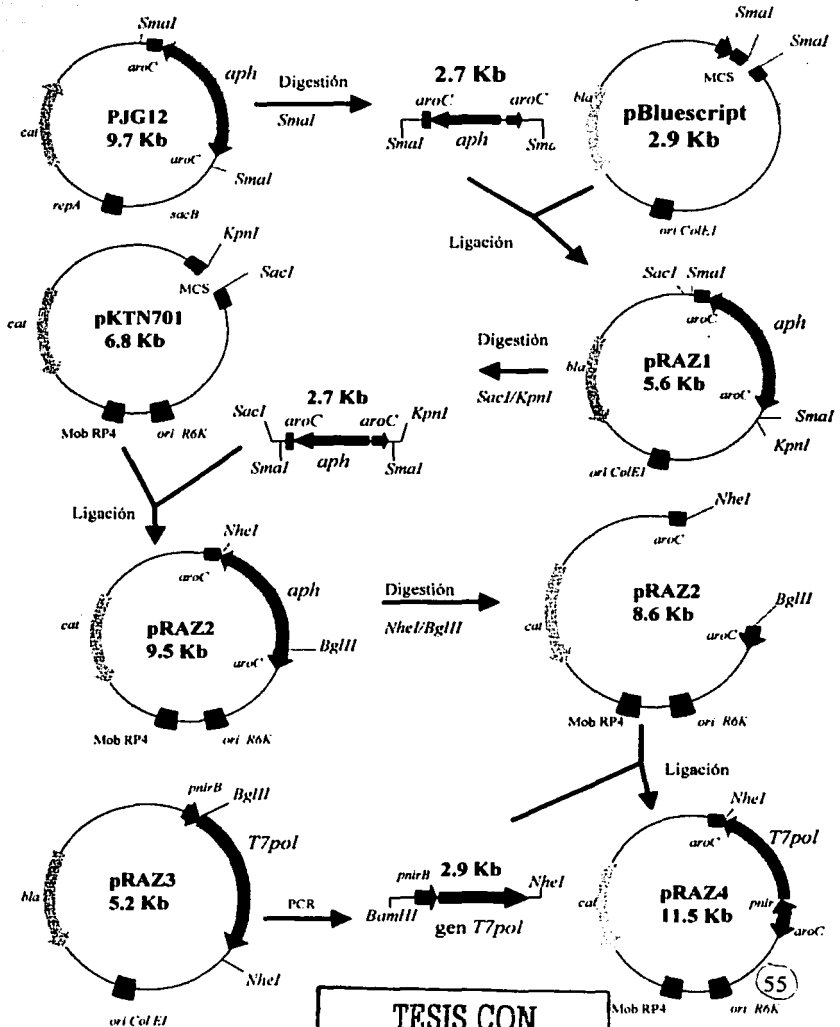
La cepa vacunal *S. typhi* CVD908 $\Delta$ SacB::*aph* presenta deleciones en los locus *aroC* y *aroD*. Dentro del locus *aroC* esta insertado el gen *aph* en tandem con el gen *sacB*. El gen *aph* confiere resistencia a kanamicina, mientras que el gen *sacB* le da sensibilidad a sacarosa al 10%. Por lo tanto, el patrón fenotípico de esta cepa vacunal es Kanamicina resistente, Sacarosa al 10% sensible.



MEDIO LB	FENOTIPO	UBICACIÓN
Cloranfenicol	Crecimiento negativo	A
Sacarosa al 10%	Crecimiento negativo	B
Kanamicina	Crecimiento positivo	C
Sin antibiótico	Crecimiento positivo	D

# FIGURA 6

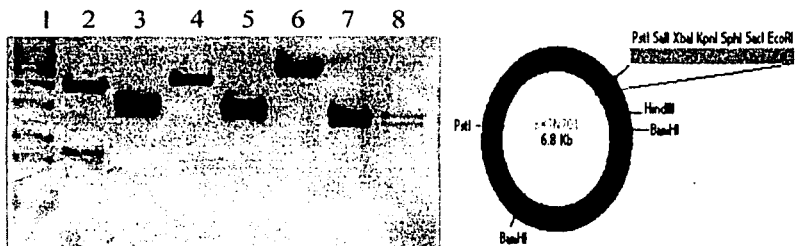
## OBTENCION DEL PLASMIDO SUICIDA pRAZA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 7

### CARACTERIZACION DEL PLASMIDO SUICIDA pKTN701 CON ENZIMAS DE RESTRICCION



Se purificó el plásmido a partir de la cepa *E.coli* SY327 y se procedió a mapearlo mediante un análisis de restricción con las siguientes enzimas:

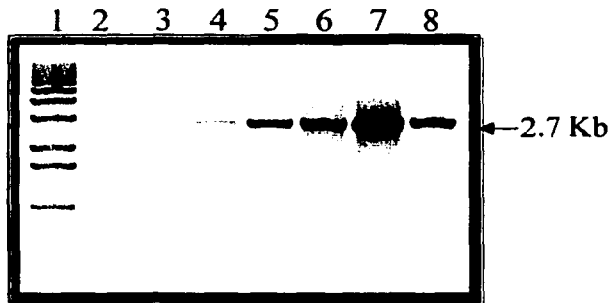
#### PATRON DE RESTRICCION pKTN701

CARRIL	ENZIMA	No. SITIOS
1	Pesos moleculares 1kb	
2	BamHI	2
3	PstI	2
4	Clal	1
5	HindIII	2
6	EcoRI	1
7	EcoRV	2
8	EcoRV	2

## FIGURA 8

### AMPLIFICACION DEL GEN DE LA T7 RNA POLIMERASA A PARTIR DE DNA CROMOSOMAL DE *E. coli* BL21(DE3)

Se amplificó el gen de la T7 RNA polimerasa a partir de DNA cromosomal de *E. coli* BL21(DE3). Los iniciadores empleados fueron NIRT7P-1 y NIRT7P-2. El producto de PCR fue amplificado bajo las condiciones mostradas a bajo.



1.- PM 1 Kb. 2,3,4,5,6,7 y 8 clonas individuales de *E. coli* BL21(D3)

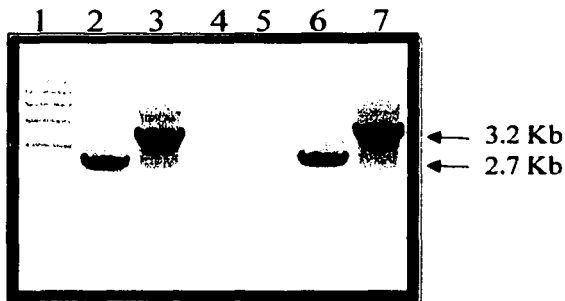
REACTIVO	CANTIDAD	TEMP(°C)	TIEMPO	CICLOS
dNTPs 200µM	3 µl	94	3 min	1
Buffer 10X	3 µl			
MgSO4	1.5 µl			
iniciador 1: PNIRT7P-1	1.5 µl	95 70 72	15 seg 45 seg 3 min	30
iniciador 2: NIRT7P-2	1.5 µl			
Vent DNA polimerasa 1U/µl	1 µl			
DNA cromosomal de bacteria hervida	5 µl	72	5 min	1
Agua inyectable	13.5 µl			
<b>Total</b>	<b>30 µl</b>			

57

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 9

### CARACTERIZACION DEL PLASMIDO SUICIDA pRAZ4 POR PCR



1.- Pesos moleculares 1Kb

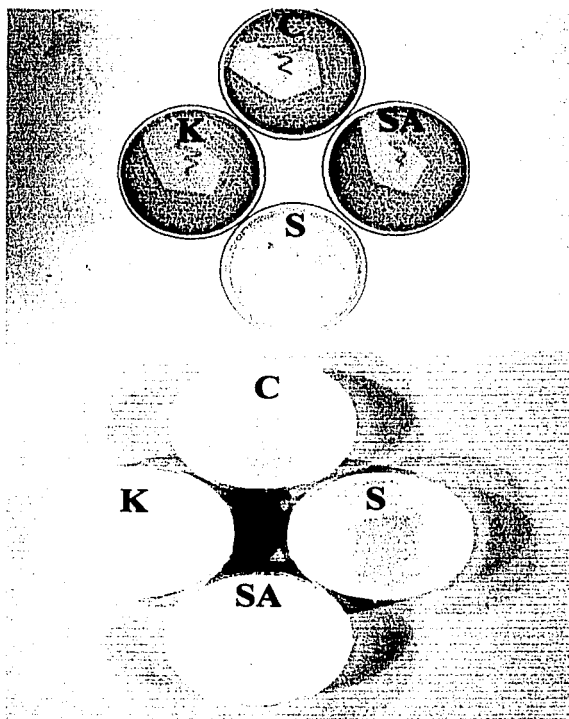
2 y 6 .- pRAZ4 (iniciadores para AroC). 3 y 7 .- pRAZ4 (iniciadores para T7pol). 4 y 5.- pKTN701 (iniciadores para T7pol)

El plásmido suicida pKTN701 fue modificado por una serie de pasos de clonación hasta dar origen al plásmido suicida pRAZ4, el cual contiene en el locus *aroC*, el gen de la T7 RNA polimerasa. En la figura se muestra la amplificación del locus *aroC* a partir del plásmido pRAZ4 y del gen de la T7 RNAPol a partir del plásmido pRAZ4 y pKTN701. Las condiciones de amplificación son las mismas que se muestran en la figura 8. Como templado se empleó 100 ng de cada plásmido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 10

### CEPAS COINTEGRANTES



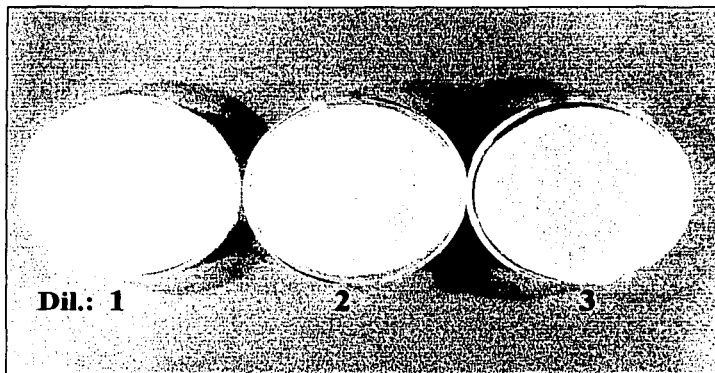
El plásmido pRAZ4 fue purificado a partir de *E. coli* SY327 y fue electroporado en *S. typhi* CVD908 $\Delta$ aroC::*sacB-aph*, las bacterias electroporadas fueron sembradas en cajas con cloranfenicol y kanamicina, las bacterias cointegrantes tienen el fenotipo Km<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>, sacarosa<sup>s</sup>

K= Kanamicina, C = Cloranfenicol, S = Sacarosa, SA = Sin antibiótico.

TESIS CON  
PARTIDA DE ORIGEN

## FIGURA 11A

### CURACION DE CEPAS COINTEGRANTES



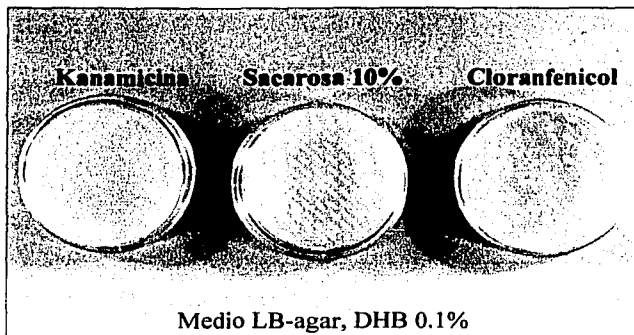
Una clona cointegrante fue seleccionada y curada, creciendo la cepa por 16 hr en presencia de sacarosa al 10% y plaqueando posteriormente en cajas sin antibiótico en presencia de DHB, en diferentes diluciones. Arriba se muestra una serie de diluciones 1:10 realizadas para obtener colonias independientes, que llevaron a cabo la segunda recombinación.

Entre las colonias aisladas se pueden encontrar bacterias que aún contienen el plásmido suicida cointegrado y bacterias curadas, es decir, las que integraron el cassette *aroC-T7 RN<sub>A</sub>pol* o bien la cepa de inicio que contiene el cassette *aroC-aph-sacB*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA-11B

### SELECCIÓN DE COLONIAS INTEGRANTES



En la figura 11B, se muestra el patrón de resistencia a Km, Cml y sacarosa de 100 colonias independientes, donde se demuestra que el 100% de las clonas perdieron el gen de sensibilidad a sacarosa, aproximadamente el 98% fueron sensibles a Kanamicina por pérdida del cassette *aphI-sacB*, mientras que el 75% de las clonas fueron sensibles a cloranfenicol, lo cual indica la desinserción del plásmido suicida del genoma de *S. typhi* CVD908.

Las colonias que crecieron en kanamicina presentan el genotipo de la cepa original.

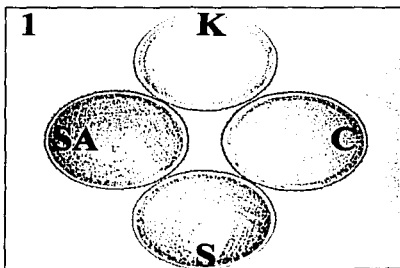
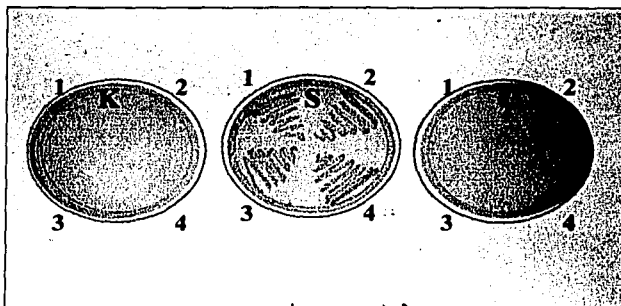
Las colonias que crecieron en Cloranfenicol presentan el genotipo de la cepa cointegrante.

Las colonias que no crecieron en cloranfenicol ni en kanamicina, pero si en sacarosa al 10%, presentan el genotipo de la cepa integrante, es decir, de la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$  *aroC-t7rnapol*.



## FIGURA 11C

FENOTIPO FINAL DE  
LA CEPA *S. typhi* CVD908 $\Omega$  *aroC-t7rnapol*



En la figura de arriba se muestran cuatro clones individuales de *S. typhi* CVD908 $\Omega$  *aroCT7rnapol*, las cuales fueron sensibles a kanamicina y cloranfenicol, pero resistentes a sacarosa al 10% ( Km<sup>s</sup>, Cml<sup>s</sup>, sacarosa<sup>r</sup>). Se seleccionó la clona 1 para su posterior análisis por PCR , figura de abajo. S = sacarosa al 10%, C = Cloranfenicol, K= Kanamicina, SA = Sin antibiótico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 12

Caracterización de la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol por PCR



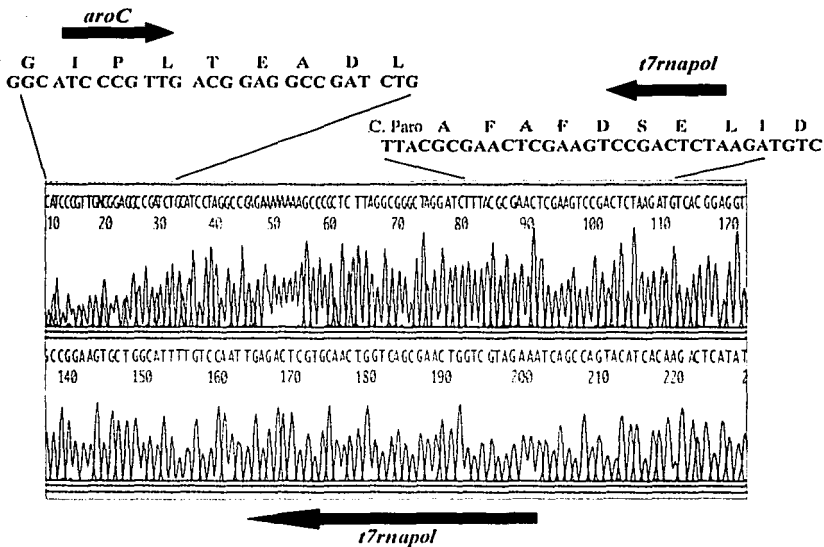
Cepas de <i>Salmonella typhi</i>						
CVD908-T7RNA <sub>pol</sub>			CVD908			Silvestre
Fragmento Parcial de la T7 <sub>pol</sub>	Fragmento completo de la T7 <sub>pol</sub>	aroC	Fragmento parcial de la T7 <sub>pol</sub>	Fragmento Completo de la T7 <sub>pol</sub>	aroC	aroC

Las cepas *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol (Km<sup>s</sup>, Cml<sup>s</sup>, sacarosa<sup>r</sup>), fue analizada por PCR. Los iniciadores empleados para amplificar el gen completo de la T7 RNA polimerasa fueron T7P-1 y T7P-3(fragmento de 2684 pb), y para amplificar la forma truncada se emplearon los iniciadores T7P-2 y T7P-3 (1376 pb). Con los iniciadores AroC-1 y AroC-2 se amplificó el cassette *aph-sac* (3200pb). Como controles del experimento se realizaron ampliificaciones del DNA genómico de *S. typhi* CVD908 y *S. typhi* 9, 12, Vi:d, con las combinaciones de iniciadores mencionadas con anterioridad.

La amplificación para el fragmento *aroC*, demuestra que la *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol contiene integrado dentro del locus *aroC* el gen de la T7 RNA polimerasa, mientras que *S. typhi* CVD908 amplifica el locus *aroC* truncado (400 pb), por otra parte, *S. typhi* 9, 12, Vi:d muestra el fragmento del gen *aroC* silvestre (1110 pb).

## FIGURA 13

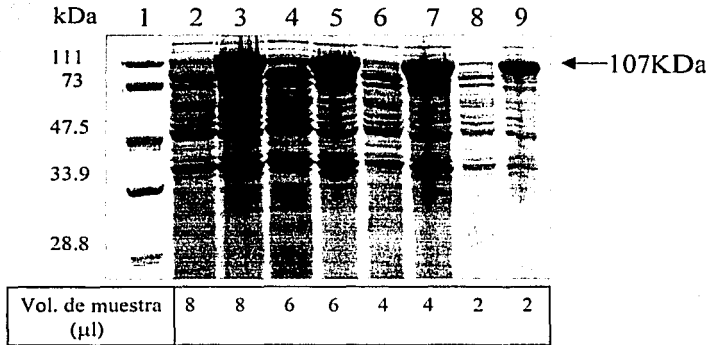
### SECUENCIACION DEL EXTREMO 5' DEL GENE *aroC* de la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ *aroCT7rnapol*



Se obtuvo DNA genómico de la cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ *aroCT7rnapol* y mediante el uso de los iniciadores *aroC*-1 y *aroC*-2, se amplificó el cassette *aroCT7rnapol*. El producto de PCR obtenido fue secuenciado en el extremo 5' del locus *aroC* empleando el iniciador *aroC*-3. Como se puede observar en la figura, el gen del la T7 RNA polimerasa fue integrado aproximadamente a 150 pares de bases del inicio del gen *aroC* en orientación negativa.

## FIGURA 14

EXPRESION DE LA T7 RNA POLIMERASA EN *E. coli* DH5 $\alpha$  TRANSFORMADA CON EL PLASMIDO pRAZ3.



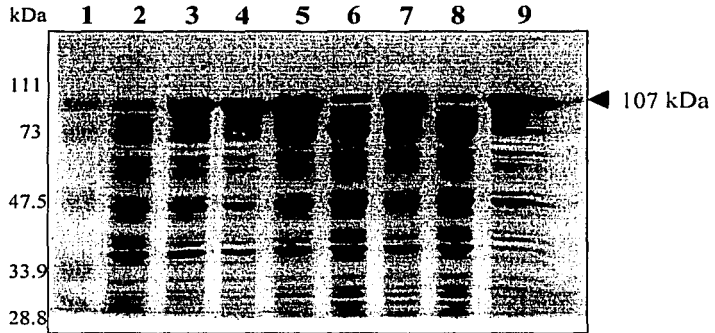
A partir de un stock de bacterias hervidas en buffer muestra de  $1 \times 10^9$  bact/ml se colocaron 8, 6,4 y 2  $\mu$ l de bacterias, según el orden mostrado en el gel SDS-PAGE que se muestra arriba, los cuales corresponden a  $8 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  bacterias respectivamente. Los carriles 2,4,6 y 8 corresponden a *E. coli* DH5 $\alpha$  pNir3; los carriles 3,5,7 y 9 corresponden a *E. coli* DH5 $\alpha$  pRAZ3.

El gel muestra una proteína recombinante muy expresada en la cepas que contienen el gen de la T7 RNA polimerasa, que no está presente en la cepa transformada solo con el vector plasmídico. La polimerasa recombinante presenta el tamaño esperado de 107 KDa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 15

### EXPRESION DE LA T7 RNA POLIMERASA EN *E. coli* SY327 TRANSFORMADA CON EL PLASMIDO pRZA4



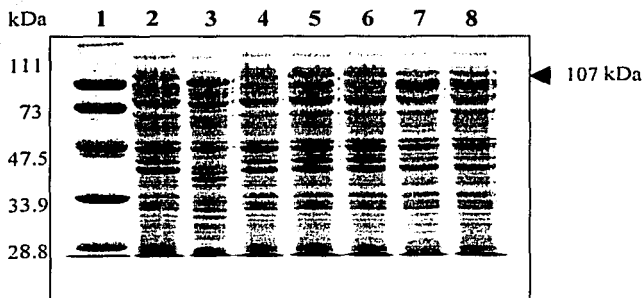
El plásmido suicida pRAZ4 fue transformado en *E. coli* SY327 y diferentes clonas fueron seleccionadas y crecidas en medio luria con cloranfenicol hasta la fase logarítmica,  $4 \times 10^6$  bacterias fueron corridas en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12.5%, demostrando la expresión de la proteína recombinante de 107 kDa.

1.- Pesos Moleculares. 3,4,5,7 y 9.- Proteínas de clonas individuales de la cepa SY327 pRAZ4. 2, 6 y 8.- Proteínas de clonas individuales de la cepa SY327 pKTN701.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 16

### EVALUACION DE LA T7 RNA POLIMERASA EN *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol



Las clonas integrantes del gen de la T7 RNA polimerasa caracterizadas por su fenotipo y genotipo, fueron analizadas en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12.5%. La polimerasa recombinante no se detectó a simple vista, desde las cepas integrantes. Esto puede deberse a su baja expresión, ya que únicamente se integró una sola copia del gen en el genoma bacteriano.

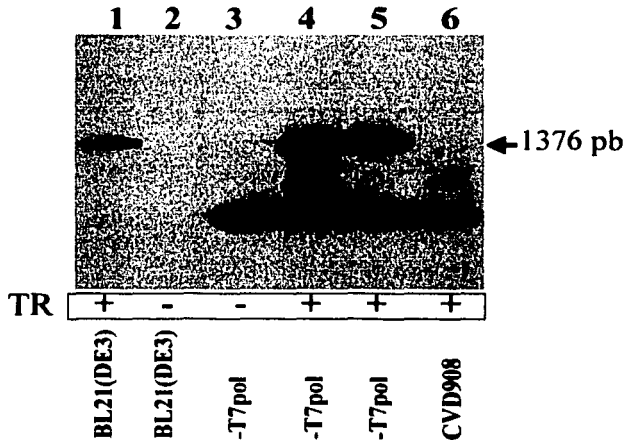
Se corrieron proteínas totales de  $1 \times 10^6$  bacterias de las siguientes cepas: 1.- PM. 2.- CVD908 $\Omega$ aroCaph-sacB. 3.- SY327 pRAZ4. 4,5,6 y 8.-Clonas individuales CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol. 7.- CVD908.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## FIGURA 17

### EVALUACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA T7 RNA POLIMERASA DESDE LA CEPA *S. typhi*

*CVD908ΩaroCT7rnapol*

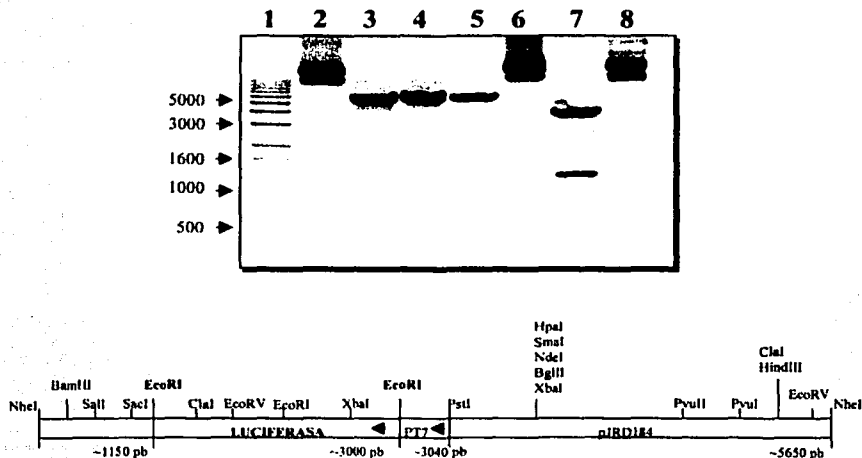


Se procedió a evaluar la expresión de RNA mensajero por medio de RT-PCR. Se obtuvo RNA total a partir de *S. typhi* CVD908ΩaroCT7rnapol (-T7pol) inducida en anaerobiosis y *E. coli* BL21(DE3) inducida con IPTG.

Se realizó un ensayo de RT-PCR en presencia y ausencia de la enzima Transcriptasa reversa (RT). Los resultados del experimento muestran amplificación de la forma truncada de la T7 RNA polimerasa con los oligos T7P-2 y T7P-3 en presencia de Transcriptasa reversa, pero no se ve amplificación alguna en ambas cepas inducidas cuando hay ausencia de la Transcriptasa reversa, lo cual demuestra que es una amplificación específica del RNA mensajero y no por contaminación con DNA genómico de las cepas bacterianas.

## FIGURA 18

### CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pIQ-LUC



Se sintetizaron oligos conteniendo la región del promotor T7, el cual fue insertado en el plásmido pJRD184, obteniéndose la clona denominada pIQ. En el sitio EcoRI del plásmido pIQ se insertó el gen de la luciferasa. El plásmido que se obtuvo se denominó pIQ-LUC, y fue digerido con diferentes enzimas de restricción para verificar su identidad .

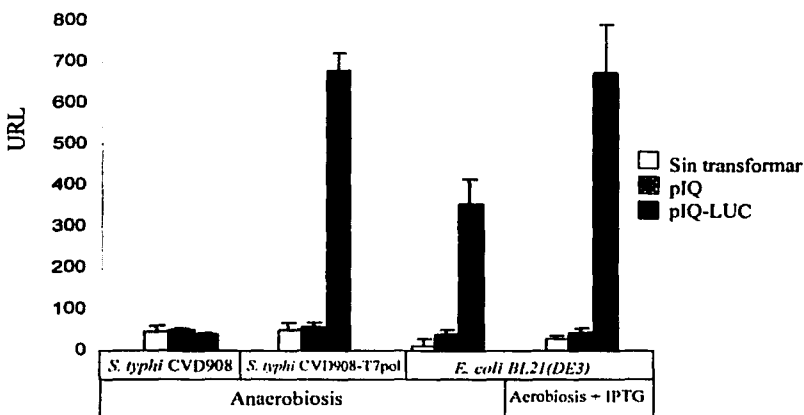
1.- Pesos moleculares 1 Kb; 2.- Plásmido sin digerir; 3.- HindIII (5650 pb); 4.- PvuII (5650 pb); 5.- SmaI (5650 pb); 6.- KpnI (Sin digerir); 7.- EcoRI (650, 1200, 3700 pb). 8.- Plásmido sin digerir. Tamaño del inserto.- 1850 pb. Tamaño del vector.- 3800 pb. Tamaño total.- 5650 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## FIGURA 19

### TRANSCOMPLEMENTACION DEL GEN DE LA T7 RNA POLIMERASA CON EL PLASMIDO pIQ-LUC EN *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol

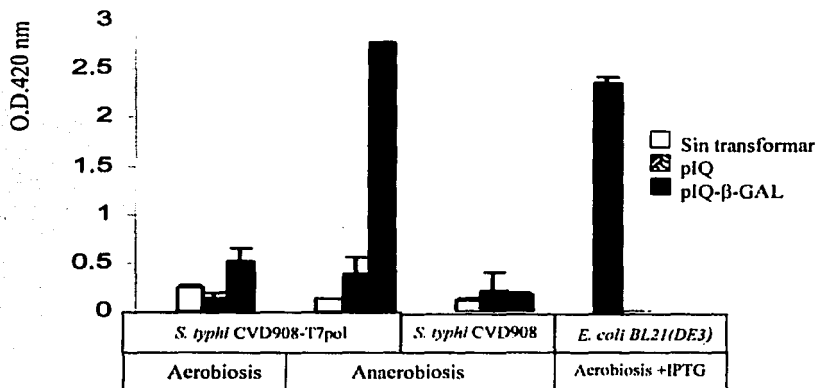


Se evaluó la capacidad de la T7 RNA polimerasa de unirse al promotor T7 y transcribir el gen que da origen a la proteína reportera luciferasa. La cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol fue transformada con el plásmido pIQ-LUC, y se evaluó la producción del gen reportero mediante la cuantificación de fotones emitidos en un ensayo de degradación de la luciferina por la luciferasa, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Los resultados obtenidos para el ensayo de luciferasa muestran la producción de la polimerasa solo en condiciones de anaerobiosis, y su complementación con el gen reportero bajo el promotor pT7.

## FIGURA 20

### TRANSCOMPLEMENTACION DEL GEN DE LA T7 RNA POLIMERASA CON EL PLASMIDO pIQ- $\beta$ -GAL EN *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol



Se evaluó la capacidad de la T7 RNA polimerasa de unirse al promotor T7 y transcribir el gen que da origen a la proteína reportera  $\beta$ -Galactosidasa. La cepa *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol fue transformada con el plásmido pIQ- $\beta$ -GAL y se evaluó la producción del gen reportero.

Se colocó en una placa de ELISA de 96 pozos, 50  $\mu$ g de proteínas totales de bacterias inducidas y 50  $\mu$ l de buffer de ensayo 2x, el cual contiene el sustrato ONPG. Después de 10 minutos se midió la densidad óptica en un lector de ELISA a 420nm. Los resultados muestran la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa solo en las clonas *S. typhi* CVD908 $\Omega$ aroCT7rnapol que fueron inducidas en condiciones de anaerobiosis.

---

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Goossens PL, Montixi C., Saron MF., Rodriguez M., Zavala F., and Milon G.(1995) *Listeria monocytogenes*: a live vector able to deliver heterologous protein within the cytosol and to drive a CD8 dependent T cell response. *Biologicals* ;23,135-43.
- <sup>2</sup> Dietrich G., Bubert A., Gentschev I., Sokolovic Z., Simm A., Catic A., Kaufmann S.H.E., Hess H., Szalay A.A., and Goebel W. (1998) Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nature Biotech.* 16:181-185
- <sup>3</sup> Dietrich G., Kolb-Maurer A., Spreng S., Schartl M., Goebel W., Gentschev I.(2001). Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine*, 21;19(17-19):2506-12
- <sup>4</sup> Francis MS. and Thomas CJ. (1997) Mutants in the CtpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog.* Feb;22(2):67-78
- <sup>5</sup> Guzman CA., Saverino D., Medina E., Fenoglio D., Gerstel B., Merlo A., Li Pira G., Buffa F., Chakraborty T. and Manca F.(1998) Attenuated *Listeria monocytogenes* carrier strains can deliver an HIV-1 gp120 T helper epitope to MHC class II-restricted human CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* Jun;28(6):1807-14
- <sup>6</sup> Paglia P., Arioli I., Frahm N., Chakraborty T., Colombo MP., Guzman CA.(1997)The defined attenuated *Listeria monocytogenes* delta mp12 mutant is an effective oral

---

vaccine carrier to trigger a long-lasting immune response against a mouse fibrosarcoma  
Eur J Immunol. Jun;27(6):1570-5.

<sup>7</sup> Schuchat A., Swaminathan B., Broome CV.(1991) Epidemiology of human listeriosis.  
Clin Microbiol Rev. Apr;4(2):169-83.

<sup>8</sup> Helenglass G, Talbot D, Jameson B, Powles RL.,1989. Possible role of person-to-person transmission of *Listeria* infection in immunocompromised patients. Lancet. Apr 15;1(8642):851.

<sup>9</sup> Wehland J. and Carl UD. (1998) The sophisticated survival strategies of the pathogen *Listeria monocytogenes*. Int Microbiol. Mar;1(1):11-8.

<sup>10</sup> Zychlinksky A., Kenny B., Ménard R., Prévost M.C., Holand B., Sansonetti P.J. (1994) IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol; 11, 619-27.

<sup>11</sup> Portnoy D.A., Chakraborty T., Goebel W., and Cossart P.(1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infect. Immun.; 60, 1263-1267.

<sup>12</sup> Ménard R., Dehio C., and Sansonetti P.J.(1996) Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. Trends in Microbiology; 4, 220-226.

<sup>13</sup> Phalipon A., Sansonetti P.(1995) Live attenuated *Shigella flexneri* mutants as vaccine candidates against shigellosis and vectors for antigen delivery. Biologicals., Jun;23(2):125-34

---

<sup>14</sup> Lindberg AA., Karnell A., Stocker BA., Katakura S., Sweiha H., Reinholt FP. (1988) Development of an auxotrophic oral live *Shigella flexneri* vaccine. *Vaccine*. Apr;6(2):146-50.

<sup>15</sup> Yoshikawa M., Sasakawa C., Okada N., Takasaka M., Nakayama M., Yoshikawa Y., Kohno A., Danbara H., Nariuchi H., Shimada H., et al (1995) Construction and evaluation of a virG thyA double mutant of *Shigella flexneri* 2a as a candidate live-attenuated oral vaccine. *Vaccine*, 13(15):1436-40.

<sup>16</sup> Noriega FR., Wang JY., Losonsky G., Maneval DR., Hone DM., Levine MM. (1994) Construction and characterization of attenuated delta aroA delta virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infect. Immun.*;62(11):5168-72.

<sup>17</sup> Noriega FR., Losonsky G., Wang JY., Formal SB., Levine MM. Further characterization of delta aroA delta virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* Jan.64(1):23-7.

<sup>18</sup> Hartman AB., Venkatesan MM. (1998) Construction of a stable attenuated *Shigella sonnei* DeltavirG vaccine strain, WRSS1, and protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model. *Infect Immun* Sep;66(9):4572-6.

<sup>19</sup> Kotloff KL., Noriega FR., Samandari T., Szein MB., Losonsky GA., Nataro JP., Picking WD., Barry EM., Levine MM. (2000) *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in virG, sen, set, and guaBA, is highly attenuated in humans. *Infect Immun.* Mar;68(3):1034-9.

- <sup>20</sup> Sizemore D.R., Branstrom A.A., Sadoff J.C.(1995) Attenuated *Shigella* as a DNA Delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science*; 270, 299-302.
- <sup>21</sup> Fennelly GJ., Khan SA., Abadi MA., Wild TF., Bloom BR. J. (1999) Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J. Immunol.* Feb 1;162(3):1603-10.
- <sup>22</sup> Barzu S., Arondel J., Guillot S., Sansonetti PJ., Phalipon A. (1998) Immunogenicity of IpaC-hybrid proteins expressed in the *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate SC602. *Infec. Immun.* Jan;66(1):77-82.
- <sup>23</sup> Altboun Z., Barry EM., Losonsky G., Galen JE., Levine MM.(2001) Attenuated *Shigella flexneri* 2a Delta guaBA strain CVD 1204 expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS2 and CS3 fimbriae as a live mucosal vaccine against *Shigella* and ETEC infection. *Infec. Immun.* May;69(5):3150-8.
- <sup>24</sup> Anderson RJ., Pasetti MF., Sztein MB., Levine MM., Noriega FR.(2000) DeltaguaBA attenuated *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1204 as a *Shigella* vaccine and as a live mucosal delivery system for fragment C of tetanus toxin. *Vaccine*, Apr 28;18(21):2193-202.
- <sup>25</sup> Tzschaschel BD., Klee SR. de Lorenzo V., Timmis KN., Guzman CA.(1996) Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri* aroD carrier strain. *Microb. Pathog.* Oct;21(4):277-88.

- 
- <sup>26</sup> Islam D., Bandholtz L., Nilsson J., Wigzell H., Christensson B., Agerberth B., Gudmundsson G.(2001) Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* Feb;7(2):180-5, Feb;7(2):158-9.
- <sup>27</sup> Ghosh AS., Kar AK., Kundu M. (1998) Alterations in high molecular mass penicillin-binding protein 1 associated with beta-lactam resistance in *Shigella dysenteriae*. *Biochem Biophys Res. Commun.* Jul 30;248(3):669-72.
- <sup>28</sup> Kadurugamuwa JL., Beveridge TJ.(1999) Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology*, Aug;145 ( Pt 8):2051-60.
- <sup>29</sup> Sirard JC; Niedergang F; Kraehenbuhl JP.(1999) Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev.*171,5-26
- <sup>30</sup> Bumann D., Hueck C., Aebischer T., Meyer.(2000) Recombinant live *Salmonella spp.* for human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* Apr;27(4):357-64.
- <sup>31</sup> Lee JS., Shin KS., Pan JG., Kim CJ. (2000) Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat Biotechnol.* Jun;18(6):645-8.
- <sup>32</sup> Zhang T. and Stanley SL. Jr. (1997) Expression of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 chi 4297 (delta cya delta crp delta asd): safety and immunogenicity in mice. *Vaccine.* Aug-Sep;15(12-13):1319-22.

- 
- <sup>33</sup> Saltzman DA., Heise CP., Hasz DE., Zebede M., Kelly SM., Curtiss R 3<sup>rd</sup>., Leonard AS, Anderson PM.(1996) Attenuated *Salmonella typhimurium* containing interleukin-2 decreases MC-38 hepatic metastases: a novel anti-tumor agent. *Cancer Biother Radiopharm.* Apr;11(2):145-53
- <sup>34</sup> Everest P., Griffiths P., Dougan G.(1995) Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. *Biologicals*; 23, 119-1.
- <sup>35</sup> Fooks AR.(2000) Development of oral vaccines for human use. *Curr Opin. Mol. Ther.* Feb;2(1):80-6.
- <sup>36</sup> VanCott JL., Staats HF., Pascual DW., Roberts M., Chatfield SN., Yamamoto M., Coste M., Carter PB., Kiyono H., McGhee JR. (1996) Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. *J. Immunol*; 156, 1504-14.
- <sup>37</sup> Zhang-Barber L; Turner AK; Barrow PA. (1999) Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine*, 17, 2538-45.
- <sup>38</sup> Pasetti MF., Anderson RJ., Noriega FR., Levine MM., Sztein MB.(1999) Attenuated delta<sub>g</sub>guaBA *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin Immunol.* Jul;92(1):76-89.



---

<sup>39</sup> Tacket CO., Kelly SM., Schödel F., Losonsky G., Nataro JP., Edelman R., Levine MM., Curtiss R 3rd. (1997) Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun.* Aug;65(8):3381-5.

<sup>40</sup> Lowe DC., Savidge TC., Pickard D., Eckmann L., Kagnoff MF., Dougan G., Chatfield SN.(1999) Characterization of candidate live oral *Salmonella typhi* vaccine strains harboring defined mutations in *aroA*, *aroC*, and *htrA*. *Infect Immun.* Feb;67(2):700-7.

<sup>41</sup> Dilts DA., Riesenfeld-Orn I., Fulginiti JP., Ekwall E., Granert C., Nonenmacher J, Brey RN., Cryz SJ., Karlsson K., Bergman K., Thompson T., Hu B., Bruckner AH., Lindberg AA.(2000) Phase I clinical trials of *aroA aroD* and *aroA aroD htrA* attenuated *S. typhi* vaccines; effect of formulation on safety and immunogenicity. *Vaccine*, Feb 14;18(15):1473-84.

<sup>42</sup> Hone D., Harris A., Chatfield S., Dougan G., Levine MM.(1991) Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine*; 9, 810-6.

<sup>43</sup> Tacket CO., Hone DM., Losonsky GA., Guers L., Edelman R., Levine M.(1992) Clinical acceptability and immunogenicity of CVD908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine*, 10, 443-6.

<sup>44</sup> Fouts TR., Lewis GK., Hone DM. (1993) Construction and characterization of a *Salmonella*-based HIV vaccine. In: *Vaccines 93 Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS*. Ginsberg HS, Brown F, Chanock RM, Lerner RA. Eds. CSHL press, USA. Pp.95-100.

<sup>45</sup> Girón JA., Xu JG., González CR., Hone D., Kaper JB., Levine MM.(1995) Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by  $\Delta$ aroC,  $\Delta$ aroD *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908. Vaccine; 13, 939-46.

<sup>46</sup> Gonzalez CR., Noriega FR., Huerta S., Santiago A., Vega M., Paniagua J., Ortiz-Navarrete V., Isibasi A., Levine MM. (1998) Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. Vaccine, 16(9-10): 1043-52.

<sup>47</sup> González C., Hone D., Noriega FR., Tacket CO., Davis JR., Losonsky G., Nataro JP., Hoffman S., Malik A., Nardin E., Szein MB., Heppner DG., Fouts TR., Isibasi A., Levine MM.(1994) *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: Strain construction and safety and immunogenicity in humans. J. Infect. Dis.; 169, 927-31.

<sup>48</sup> Tacket CO., Szein MB., Wasserman SS., Losonsky G., Kotloff KL., Wyant TL., Nataro JP., Edelman R., Perry J., Bedford P., Brown D., Chatfield S., Dougan G., Levine MM. (2000) Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccine CVD 908-htrA in U.S. volunteers. Infect Immun. Mar;68(3):1196-201

<sup>49</sup> Tacket CO., Galen J., Szein MB., Losonsky G., Wyant TL., Nataro J., Wasserman SS., Edelman R., Chatfield S., Dougan G., Levine MM. (2000) Safety and immune responses to attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C. Clin Immunol. Nov;97(2):146-53

---

<sup>50</sup>Orr N., Galen JE., Levine MM.(1999) Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM (197), and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA. Infect Immun. Aug;67(8):4290-4

<sup>51</sup> Wu S., Beier M., Szein MB., Galen J., Pickett T., Holder AA., Gomez-Duarte OG., Levine MM.(2000) Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C.J Biotechnol. Sep 29;83(1-2):125-35.

<sup>52</sup> Gomez Duarte OG., Pasetti MF., Santiago A., Szein MB., Hoffman SL and Levine MM. (2001)Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains.Infec. Immun. Feb;69(2):1192-8.

<sup>53</sup> Kantle A., Hakkinen M., Moldoveanu Z., Lu A., Savilahti E., Alvarez RD., Michalek S., Mestecky J.(1998) Differences in immune responses induced by oral and rectal immunizations with *Salmonella typhi* Ty21a: evidence for compartmentalization within the common mucosal immune system in humans.Infect Immun. Dec;66(12):5630-5.

<sup>54</sup> Galen J. E., K. Nakayama and R. Curtiss III. (1990) Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium* : use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. Gene 94:29-35.

<sup>55</sup> Herrero M., de Lorenzo V, Timmis KN .(1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance, selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J Bacteriol. Nov;172(11):6557-67.

---

<sup>55</sup> Haapa S., Taira S., Heikkinen E., Savilahti H.(1999) An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons in vitro: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;27(13):2777-84.

<sup>57</sup> Hone D; Attridge S; van den Bosch L; Hackett J.(1988) A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microb Pathog.*;5, 407-18.

<sup>58</sup> Mollet B; Knol J; Poolman B; Marciset O; Delley M.(1993) Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.*;175, 4315-24.

<sup>59</sup> Recorbet G; Robert C; Givaudan A; Kudla B; Normand P; Faurie G., Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis* sacB gene. *Appl Environ Microbiol.*;59, 1361-6.

<sup>60</sup> Ge Y; Old IG; Girons IS; Charon.(1997) The *flgK* motility operon of *Borrelia burgdorferi* is initiated by a sigma 70-like promoter. *Microbiology.*;143, 1681-90.

<sup>61</sup> Ide N; Ikebe T; Kutsukake K.(1999) Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Genes Genet Syst.*; 74,113-6.

<sup>62</sup> Malo MS; Loughlin RE.(1990) Promoter elements and regulation of expression of the *cysD* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene*;87, 127-31.

---

<sup>62</sup> Cowan PJ., Nagesha H., Leonard L., Howard JL., Pittard AJ. (1991) Characterization of the major promoter for the plasmid-encoded sucrose genes *scrY*, *scrA*, and *scrB*. *J Bacteriol.*;173, 7464-70.

<sup>64</sup> Suziedlien E., Suziedlis K., Garbencit V., Normark S. (1999) The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J Bacteriol.*;181,2084-93.

<sup>65</sup> Gupta JC., Jaisani M., Pandey G., Mukherjee KJ. (1999) Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible lambda PL promoter. *J Biotechnol.*;68, 125-34.

<sup>66</sup> Mujacic M., Cooper KW., Baneyx F. (1999) Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene*;238, 325-32.

<sup>67</sup> Dunstan SJ., Simmons CP., Strugnell RA. (1999) Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Infect Immun.* Oct;67(10):5133-41.

<sup>68</sup> Oxer MD., Bentley CM., Doyle JG., Peakman TC., Charles IG., Makoff AJ. (1991) High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated *nirB* promoter. *Nucleic Acids Research.*; 19, 2889-92.

<sup>69</sup> Chatfield SN., Charles IG., Makoff AJ., Oxer MD., Dougan G., Pickard D., Slater D., Fairweather NF. (1992) Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of

---

heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: Development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology*;10, 888-92.

<sup>70</sup> Ward SJ., Douce G., Figueiredo D., Dougan G., Wren BW. (1999) Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun*. May;67(5):2145-52.

<sup>71</sup>Newton SM., Klebba PE., Hofnung M., Charbit A.(1995) Studies of the anaerobically induced promoter *pnirB* and the improved expression of bacterial antigens. *Res Microbiol* .146, 193-202.

<sup>72</sup> Gould SJ., Subramani S. (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* . Nov 15;175(1):5-13.

<sup>73</sup> DiLella AG., Hope DA., Chen H., Trumbauer M., Schwartz RJ., Smith RG.(1988) Utility of firefly luciferase as a reporter gene for promoter activity in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*. May 11;16(9):4159.

<sup>74</sup>Welsh S., Kay SA.(1997) Reporter gene expression for monitoring gene transfer *Curr Opin. Biotechnol*. Oct;8(5):617-22.

<sup>75</sup> Panayotatos N, Well R.1979. Recognition and initiation site for four late promoters of phage T7 es a 22-base pair DNA sequence. *Nature* ;280,35-9.

<sup>76</sup> Rong M., He B., McAllister WT., Durbin RK.(1998) Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95, 515-9.

- 
- <sup>77</sup> Sastry S., Ross BM.(1999) Probing the interaction of T7 RNA polymerase with promoter. *Biochemistry*;38, 4972-81.
- <sup>78</sup> Sousa R., Padilla R. (1995) A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase. *EMBO J.*14, 4609-21.
- <sup>79</sup> Brieba LG., Sousa R. (2000) Roles of histidine 784 and tyrosine 639 in ribose discrimination by T7 RNA polymerase. *Biochemistry*;39, 919-23.
- <sup>80</sup> Graham M. T., Cheetham and Thomas A. Steitz.(1999) Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science*, 17;286(5448):2305-9
- <sup>81</sup> Cheetham GM., Jeruzalmi D., Steitz TA.(1999) Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature*,399, 80-3. erratum publicado en *Nature* 1999;400, 89.
- <sup>82</sup> Studier W., Moffatt BA.(1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*; 189,113-30.
- <sup>83</sup> Fedorova ND., Peredelchuk MY., Kirpichnikov MP., Bennett GN.(1996) *Escherichia coli* strain for thermoinducible T7 RNA polymerase-driven expression. *Gene*, Oct 24;177(1-2):267-8.
- <sup>84</sup> Brunschwig E., Darzins A. (1992)A two-component T7 system for the overexpression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* ;111, 35-41. erratum publicado en *Gene* 1992;119,153.

- 
- <sup>85</sup> Conrad B., Savchenko R.S., Breves R., Hofemeister J.(1996) A T7 promoter-specific, inducible protein expression system for *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.*;250, 230-6.
- <sup>86</sup> Steidler L., Wells J.M., Raeymaekers A., Vandekerckhove J., Fiers W., Remaut E. (1995) Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Appl Environ Microbiol.*;61, 1627-9.
- <sup>87</sup> Wirtz E., Hartmann C., Clayton C.(1994) Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*;22, 3887-94.
- <sup>88</sup> Mertens N., Remaut E., Fiers W. (1995) Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Biotechnology (N Y)*;13,175-9.
- <sup>89</sup> Dersch P., Fsihi H., Bremer E.(1994) Low-copy-number T7 vectors for selective gene expression and efficient protein overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.*;123, 19-26.
- <sup>90</sup> Dubendorff J.W., Studier F.W.(1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol.*;219, 45-59.
- <sup>91</sup> Tabor S., Richardson C.C.(1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA*;82, 1074-8.



---

<sup>92</sup> Tong Q., Yang S., Gong Y.(1999) A new system for expressing heterologous gene in *Escherichia coli* regulated by oxygen consistence in the environment. Chin J Biotechnol;15, 177-82.

<sup>93</sup> Studier FW.(1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J Mol Biol.;219, 37-44.

<sup>94</sup> Komai T; Ishikawa Y; Yagi R; Suzuki-Sunagawa H; Nishigaki T; Handa H.(1997) Development of HIV-1 protease expression methods using the T7 phage promoter system. Appl Microbiol Biotechnol.;47, 241-5.

<sup>95</sup> Rees GS; Ball C; Ward HL; Gee CK; Tarrant G; Mistry Y; Poole S; Bristow AF. (1999) Rat interleukin 6: expression in recombinant *Escherichia coli*, purification and development of a novel ELISA. Cytokine ;11, 95-103.

<sup>96</sup> Nevin DE; Pratt JM.(1991) A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter.FEBS Lett;291, 259-63.

<sup>97</sup> Lieber A; Kiessling U; Strauss M.(1989) High level gene expression in mammalian cells by a nuclear T7-phase RNA polymerase. Nucleic Acids Res;17, 8485-93.

<sup>98</sup> Brisson M; He Y; Li S; Yang JP; Huang L.(1999)A novel T7 RNA polymerase autogene for efficient cytoplasmic expression of target genes. Gene Ther.;6, 263-70.

<sup>99</sup> Elroy-Stein O; Fuerst TR; Moss B. (1989)Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the

---

vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. Proc Natl Acad Sci USA.;86, 6126-30.

<sup>100</sup> Li Z; Tyrrell DL.(1999) Expression of an enzymatically active polymerase of human hepatitis B virus in an coupled transcription-translation system. Biochem Cell Biol;77, 119-26.

<sup>101</sup> Fuerst TR; Earl PL; Moss B. (1987) Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. Mol Cell Biol;7, 2538-44.

<sup>102</sup> Povlock SL; Amara SG.(1998) Vaccinia virus-T7 RNA polymerase expression system for neurotransmitter transporters. Methods Enzymol.;296, 436-43.

<sup>103</sup> Dong J; Hunter E.(1993) Analysis of retroviral assembly using a vaccinia/T7-polymerase complementation system. Virology;194, 192-9.

<sup>104</sup> Wakita T; Moradpour D; Tokushihge K; Wands JR. (1999) Antiviral effects of antisense RNA on hepatitis C virus RNA translation and expression. J Med Virol;57, 217-22.

<sup>105</sup> Sambrook J., Fritsch. E.F. and Maniatis T. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

<sup>106</sup> Kochetkov S.N., Rusakova E.E. and Tunitskaya V.L. (1998) Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. FEBS Letters. 440, 264-267.

---

<sup>107</sup> Lattermann C.T., Yan Z.X., Matzen A., Meyer T.F. and Apfel H.(1999). Immunogenicity of the extracellular copper/zinc superoxide dismutase of the filarial parasite *Acanthocheilonema viteae* delivered by a two-phase vaccine strain of *Salmonella typhimurium*. *Parasite Immunol.* 21, 219-24.