



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**"ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B POR LA VÍA CD40-CD154 INDUCIDA POR
LA INTERACCIÓN CON UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN OmpC-CD154"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
"INMUNOLOGÍA"**

PRESENTA EL ALUMNO

MARIO ISRAEL VEGA PAREDES

Tutor: Dr. César R. González Bonilla

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

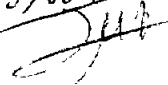
**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández" del Centro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la tutoría del Dr. César Raúl González Bonilla y en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Bajo la asesoría del Dr. Leopoldo Santos Argumedo. El proyecto fue aprobado por el comité de investigación local del IMSS (99-693-0014) y recibió financiamiento por parte de la UNAM, CONACYT (proyecto M28958) y por el IMSS (FP-0038/769). El autor recibió una beca del IMSS y de CONACYT.

CONTENIDO

I. RESUMEN	5
II. ABSTRACT	6
III INTRODUCCIÓN	7
III.1 El Binomio CD40.CD154	7
III.2 Señalización a travez de CD40	10
III.3 Estructura de CD40 y su Ligando	13
III.4 Inmunoterapia empleando CD154	18
III.5 Porinas	20
III.6 Expresión de péptidos en la superficie de enterobacterias	23
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
V. HIPOTESIS	25
VI. OBJETIVOS	25
VII MATERIAL Y MÉTODOS	25
VII.1 Cepas Bacterianas	25
VII.2 Plasmidos	26
VII.3 Ingeniería Genética	26
VII.3.1 Purificación y Cuantificación de ADN.	26
VII.3.1a Cuantificación de ADN	26
VII.3.1b Purificación de ADN	27
VII.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	27
VII.3.3 Reclonación del gene quimérico	28
VII.3.4 Caracterización del gene quimérico	28
VII.4. Metodos Bioquimicos	29
VII.4.1 Purificación de la proteína de fusión OmpC y OmpC-gp39 recombinante	29
VII.4.2 Determinación de la concentración de proteínas	30
VII.4.3 Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida(SDS-PAGE)	30
VII.4.4 Inmunoelectrotransferencia (Western Blot)	31
VII.4.5 Conjugado de la proteína OmpC-gp39 y OmpC a Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	31
VII.4.6 Ensayo de unión de CD40/OmpC-CD154	32
VII.4.6.1 Ensayo Inmunoenzimático en Fase Sólida (ELISA)	32
Unión CD40/OmpC-gp39	32
Ensayo de Inhibición	32
Ensayo de unión OmpC-gp39/CD40	33
Ensayo de competencia	33
Citometría de Flujo (FACS)	33
Ensayo de unión de OmpC-gp39/CD40 en células Raji	33
VII.5. Metodos Inmunológicos	34
VII.5.1 Líneas Celulares	34

VII.5.2	Purificación de linfocitos B de sangre periférica	34
VII.5.3	Ensayo de activación de células B humanas	35
VII.5.4	Ensayo de Proliferación de Células B humanas	35
VII.5.5	Ensayo de diferenciación de Células B humanas	36
VIII. RESULTADOS		36
VIII.1	Construcción y expresión de la proteína de fusión OmpC-gp39	36
VIII.2	La proteína de fusión OmpC-gp39 se expresa en UH302	38
VIII.3	La proteína de fusión OmpC-gp39 se une a CD40 soluble	40
VIII.4	La proteína de fusión OmpC-gp39 se une al linfoma de células B humano Raji	43
VIII.5	La proteína de fusión OmpC-gp39 activa al linfoma de B Humano Raji	45
VIII.6	La proteína de fusión OmpC-gp39 activa Linfocitos B humanos de sangre periférica	46
VIII.7	La proteína de fusión OmpC-gp39 induce proliferación de Linfocitos B de Sangre periférica	48
IX.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		50
X. REFERENCIAS		78

MARIO I. VELO
28/08/04


I. RESUMEN.

En los últimos años se han descrito diversos métodos que permiten la expresión de péptidos heterólogos en la superficie bacteriana, los cuales han sido de gran utilidad para estudios topológicos de proteínas ancladas a las membranas, generación de anticuerpos policlonales específicos y desarrollo de vacunas. La proteína de membrana externa C (OmpC) de *Salmonella enterica* serovar Typhi ha sido utilizada con este propósito, ya que contiene sitios permisivos donde es posible insertar y expresar oligopéptidos "pasajeros" que se producen como proteínas de fusión sin alterar la conformación terciaria de la OmpC. Considerando que se ha identificado una región de CD154 (W140-S149), la cual se cree contiene los residuos encargados de interactuar con CD40, se decidió insertarla en la superficie de la porina OmpC y se evaluó su capacidad de la proteína de fusión resultante (OmpC-gp39) para unirse y activar células B a través de CD40. Mediante el análisis de trabajos realizados sobre la topología de la interacción de TNF-TNFR así como de reportes sobre el análisis de la interacción CD40/CD154, y basándose en modelos moleculares y mutagénesis sitio dirigidas, nosotros logramos predecir una secuencia de aminoácidos de CD154 que se une a CD40 (WAEKGYTMS). Se demostró mediante ELISA que la proteína de fusión que contiene esta región OmpC-gp39 se une a CD40 y que es capaz de activar células B, induciendo un incremento en la expresión de MHC-II, CD23 y CD80. La proteína de fusión OmpC-gp39 fue capaz de unirse a una proteína recombinante CD40-Fc y esta unión se inhibió al emplear un exceso de la proteína CD154 recombinante o por competencia con la proteína CD40-Fc soluble. La proteína de fusión OmpC-gp39 fue capaz de incrementar la expresión de MHC-II, CD23 y CD80 en la línea celular de linfoma B humanos Raji, de manera similar que con un anticuerpo anti-CD40 activador que fue usado como control. Estos resultados sugieren que la interacción de CD154-CD40 es similar al del TNF-TNFR. Este trabajo es el primer reporte de una proteína de fusión que contenga una pequeña región de amino ácidos, la cual es capaz de activar a su receptor específico. Nuestros resultados ayudan a comprender la interacción CD40/CD154, la cual es indispensable en los mecanismos de cooperación de linfocitos T y B.

II. ABSTRACT.

Several methods intended for the expression of heterologous peptides on the bacterial surface have been described over the recent years, which have been helpful tools for topology studies of membrane anchored proteins, for the generation of polyclonal specific antibodies and for vaccine development. *Salmonella enterica* serovar Typhi outer membrane protein C (OmpC) has been used for these purposes because it contains permissive sites where “passenger” oligopeptides may be inserted, producing fusion proteins without disrupting the OmpC tertiary structure. Considering that the CD154 (W140-S149) region has been identified as a putative amino acid strand which interacts with CD40, we decided to express it on the surface of the OmpC porin and evaluate the ability of the resulting fusion protein (OmpC-gp39) to bind and activate B cells through CD40. The CD154 amino acid strand which binds to CD40 (WAEKGYTMS) was first predicted taking into account topographic studies and crystallographic models of the TNF-TNFR interaction and based on the information of site directed mutagenesis studies of the CD40/CD154 interaction. The capability of the OmpC-gp39 fusion protein to bind CD40 was demonstrated by ELISA and its ability to activate B cells was determined by the increase of MHC-II, CD23 and CD80 by flow cytometry. The fusion protein OmpC-gp39 was able to bind a recombinant CD40-Fc protein and was inhibited by an excess of recombinant CD145 or soluble CD40-Fc. The fusion protein OmpC-gp39 was able to induce MHC-II, CD23 and CD80 expression in the Raji B cell lymphoma in a comparable extent as the anti-CD40 activator monoclonal antibody used as control. These results suggest that the CD154-CD40 interaction occurs in a similar way than the TNF-TNFR. This is the first report of a fusion protein bearing a small CD154 amino acid strand, which is able to activate its specific receptor. Our results may help to understand the interaction of CD40 with CD154, which plays an important role in the cooperation mechanisms between T and B lymphocytes.

III. INTRODUCCION.

III.1 El binomio CD40-CD154.

La interacción de CD40 con su ligando (CD40L, TRAP, gp39 o CD154) durante la fase de inducción de la respuesta inmune determina que las distintas células del sistema inmunológico se activen y diferencien.

CD40 es miembro de la súper familia del receptor de TNF y se expresa constitutivamente en la superficie de linfocitos B maduros e inmaduros, células dendríticas, progenitores hematopoyéticos, queratinocitos (2), células del epitelio basal (3), macrófagos (4), células de Langerhans (5), células endoteliales (6;7), células del epitelio tímico (8), fibroblastos, microglia, neuronas (9), en algunos carcinomas (10), líneas celulares derivadas de melanomas (11) y células T (12). CD154 está relacionado estructuralmente con el TNF (13) y se expresa en los linfocitos TCD4⁺ que han sido activados a través del complejo TCR-MHC más la señal coestimuladora (14), células T CD8⁺ (15) y algunas clonas de CD8⁺ (16), así como en células T $\gamma\delta$. Se ha determinado la expresión de CD154 en células T del tipo Th0, Th1 y en Th2 (17). De igual manera, la expresión de CD154 se ha determinado en células T de memoria y células T "naive" de manera similar que en células T CD4⁺ activadas (17). Además, se ha demostrado la expresión de CD154 en basófilos (18), eosinófilos (19), mastocitos, células NK, monocitos, células del endotelio vascular, células de músculo liso, astrocitos (20), linfocitos B y plaquetas activadas (21).

La señalización a través de CD40 promueve el crecimiento, supervivencia y diferenciación de los linfocitos B, así como la producción de inmunoglobulinas, cambio de isotipo, formación de centros germinales e inducción de linfocitos B de memoria. También influye en el estado de activación de células dendríticas, y endoteliales (22;23). La interacción CD40-CD154 es esencial en el desarrollo de la inmunidad humoral para antígenos dependientes de timo. Las señales que recibe el linfocito B a través de CD40 durante su interacción con el linfocito T, en combinación con distintas citocinas, son responsables del isotipo de

inmunoglobulinas que secreta. La falta de interacción CD40-CD154 en humanos, causa la ausencia de IgG, IgA o IgE en el suero, con un marcado incremento de IgM (24-27) conocido como el síndrome de hiper-IgM. Se han descrito diferentes defectos genéticos implicados en este síndrome (28). En el síndrome HIGM1 se encuentran mutaciones en el gen *cd154*. El síndrome XHM-ED se debe a defectos en vías de señalización de NF- κ B, pues se han encontrado mutaciones en los dominios de dedos de zinc del regulador de NF- κ B conocido como IKK γ . Los defectos en la proteína AID (Activation-induced cytidine deaminase) induce el síndrome conocido como HIGM2. Por último, el síndrome de hiper-IgM. HIGM3 implica defectos autosómicos en la proteína CD40.

La respuesta inmune de ratones deficientes en CD154 es similar a la de humanos ante antígenos timo dependientes; Sin embargo, responden de forma normal frente a antígenos timo independientes (29;30). Por otro lado, se ha establecido que en la presencia de citocinas apropiadas, células dendríticas y monocitos estimulados con IFN- α , IFN- γ , o LPS que expresan BlyS y APRIL son capaces de inducir cambio de isotipo de inmunoglobulinas en linfocitos B de manera independiente de CD40 (31).

La activación de los linfocitos T vía TCR en presencia de la señalización CD40-CD154, induce la expresión de B7 en los linfocitos B (32). Considerando que CD40 se expresa en líneas de linfocitos B en desarrollo y en células B progenitoras, se pensaba que CD40 pudiera participar en su diferenciación; sin embargo, los ratones deficientes en CD154 muestran que CD40 no parece intervenir en ese proceso (33).

La señalización eficiente entre CD154 y CD40 requiere primero de la agregación de CD154 antes de su interacción con CD40 (34). Esta agregación es dependiente de la activación de esfingomielinasa ácida (ASM) en la membrana celular y de la formación de ceramida que induce la producción de micro dominios, "lipid rafts" o "balsas lipídicas", que son dominios membranales ricos en lípidos resistentes a detergentes. Conjuntar varios monómeros de estos receptores en la membrana celular permite la interacción y acoplamiento con segundos mensajeros en los dominios intracitoplásmicos de estas

proteínas. La importancia de la agregación de CD154 en los linfocitos T se demuestra por el hecho de que es un evento anterior e indispensable para una inducción eficiente de señalización en linfocitos B (35) y células dendríticas (36). CD154 al interactuar con su ligando CD40 en la superficie de los linfocitos B, induce a su vez su agregación y translocación a balsas lipídicas. Sin embargo, la agregación de CD40 dependiente de su interacción con CD154 no es un evento suficiente para generar una señal de activación sostenida de los linfocitos B. Estas balsas lipídicas presentes en células presentadoras de antígeno contienen moléculas MHC-II antes de estar en contacto con el linfocito T, lo que indica que la movilización de CD40 al interior de estos dominios incrementa la densidad de moléculas coestimuladoras y consecuentemente, la activación del linfocito T y de la célula presentadora. La agregación rápida de MHC-II y CD80 dentro de las balsas lipídicas correlaciona con un incremento en la capacidad de estimular linfocitos T, el cual es precedido por el incremento en la expresión de CD80 (37).

Las señales inducidas tanto por el receptor de linfocitos B (BCR) como por CD40 son capaces de cooperar de manera sinérgica o aditiva (38). TRAF2 y TRAF3 tienen funciones diferentes en el sinergismo del BCR y CD40. Se requiere de la interacción con TRAF2 para la señal sinérgica entre BCR y CD40 si TRAF3 se une a CD40. Sin embargo, la función de TRAF2 en este contexto puede tener un efecto negativo de TRAF3 (39).

La interacción de CD40-CD154 es fundamental en la activación de los linfocitos B en respuesta a antígenos timo-dependientes (14;17), en tanto que no se requiere ante antígenos timo- independientes (40;41). CD154 se expresa en células T CD4⁺ tanto Th1 como Th2, esta expresión está regulada por citocinas; en particular por TGF- β , IFN- γ , IL-1, IL-2 e IL-4. La interacción de CD40 con CD154 sinergiza con la IL-12 para la inducción de la producción de IFN- γ , citocina que a su vez incrementa la producción de IL-12 y estimula la expresión de CD58, CD80 y CD86 en la célula presentadora de antígenos, sugiriendo que esta interacción es bidireccional, pues promueve la activación tanto de las células presentadoras como de las células T.

La interacción CD40-CD154 no parece participar en el desarrollo y permanencia de células T maduras, pues aunque los ratones deficientes de CD154 muestran formación deficiente de centros germinales y pobre respuesta de células B de memoria (42), el número de linfocitos T de bazo es normal y no hay diferencia en las proporciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

La interacción CD40-CD154 también es necesaria en la respuesta inmune celular contra microorganismos intracelulares, por ejemplo los ratones deficientes de CD40 o de CD154 no son capaces de controlar la infección por *Leishmania* (43-45). La activación de monocitos y macrófagos requiere de las señales generadas por la célula T CD4⁺, entre las que se incluye la unión de CD40 con CD40L, pues ésta estimula la producción de IL-1 α , TNF- α , IL-6 e IL-8, así como el rescate de apoptosis de los monocitos en circulación. Por ello, se considera que la interacción CD40/CD154 interviene en el proceso de inflamación mediado por monocitos. Además, trabajos con células T provenientes de ratones deficientes de CD154, indican que los macrófagos requieren de la interacción de CD40/CD154 para su activación y producción de TNF- α y óxido nítrico (NO). Se requiere IL-12 para la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune celular de tipo Th1 y para la activación de células NK. Consecuentemente, la interacción de CD40/CD154 es indispensable para el desarrollo de la respuesta inmune mediada por células (CMI) contra microorganismos intracelulares (46). Por otro lado, las células NK humanas activadas por IL-12 expresan CD154 lo que les proporciona una vía de activación durante el mecanismo de citotoxicidad de células que expresan CD40 (47).

III.2 Senalización a través de CD40.

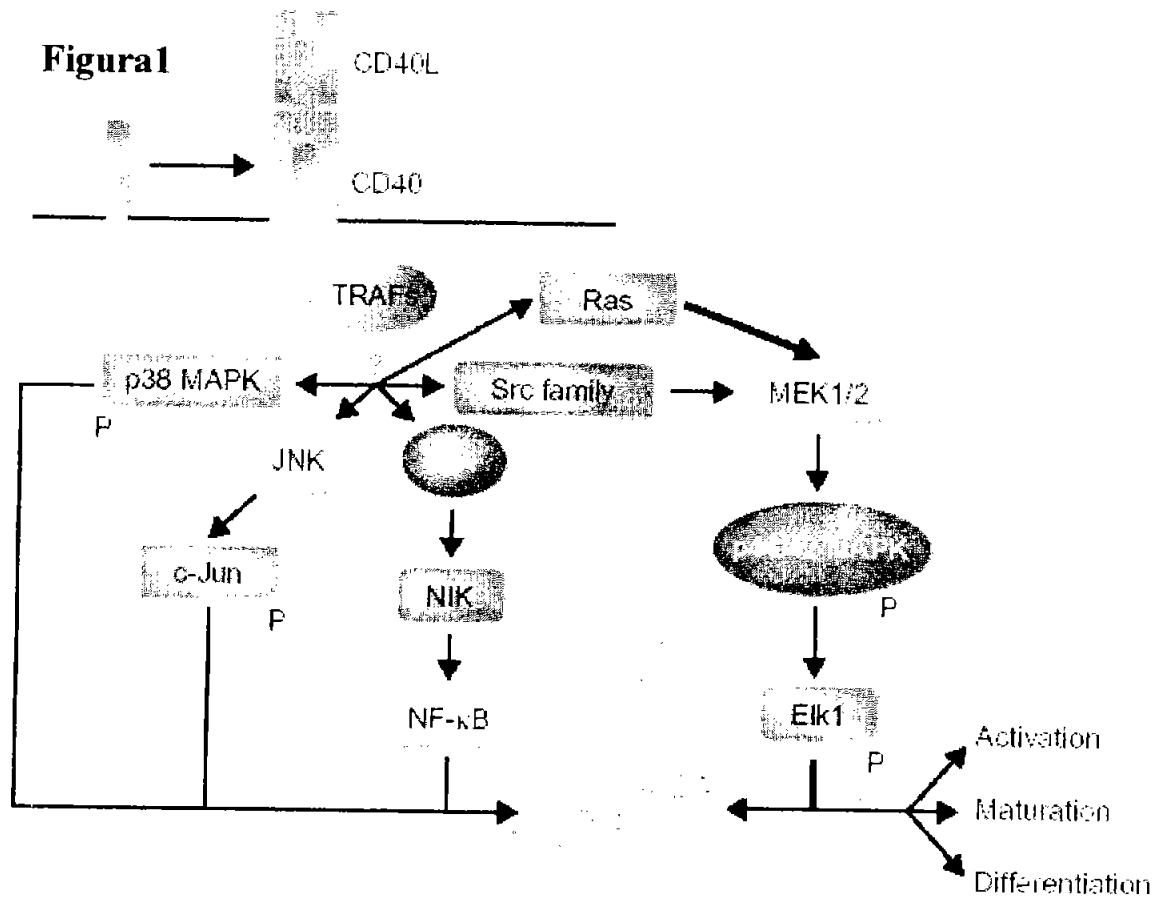
CD40 utiliza preferentemente la vía de señalización Jak3-STAT3 en los linfocitos B (48), aunque también el cambio de isotipo de inmunoglobulinas implica la activación de NF- κ B/Rel (49). Jak3 está constitutivamente asociado con CD40 mediante una interacción que requiere de una secuencia rica en prolina en la región próxima a la membrana del CD40 (aa 222-229). Se sabe que CD40 interactúa con el Factor Asociado al Receptor de TNF-2

(TRAF2), ya que media la señalización positiva desencadenada por la interacción con CD154 (50). Esta interacción se conoce gracias al análisis cristalográfico de la región de CD40 y TRAF2 (51). El dominio intracelular de CD40 contiene un sitio de unión a TRAF6 (aa 231-236) y un dominio de unión a TRAF2 (aa 250-254) que es capaz de unir ambos TRAF2 y TRAF3 (52). TRAF2 y TRAF3 se unen respectivamente a TRAF1 y TRAF5. La ligación de CD40 en linfocitos B causa la activación de las Proteín Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) JNK y p38 (53), además de NF- κ B a través de la acción del activador Act1 y reclutamiento de la cinasa inductora de NF- κ B (NIK). Las cinasas de la familia Src/Lyn también participan en la vía de señalización inducida por CD40 en monocitos (54). Por otro lado, las proteínas TRAF2 y TRAF6 sinergizan en la activación de NF- κ B (52), TRAF6, TRAF2 y TRAF3 activan a JNK y p38 (55). El cambio de isotipo de inmunoglobulinas mediado por CD40 está controlado por la unión de TRAF2 y TRAF3 y estas proteínas promueven la activación de los promotores de γ 1 y ϵ dependientes de NF- κ B (56). Finalmente, la subsiguiente degradación de TRAF2 dependiente de la ubiquitinación, constituye un mecanismo de regulación de la señalización (57). Por otro lado, se ha reportado la proteína TTRAP (proteína asociada al receptor de TNF y TRAF) es capaz de inhibir la activación de NF- κ B inducida por CD40 (58).

La señalización mediada por CD40 incrementa la expresión de ciertas citocinas y quimiocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α y MIP-1 α) (9), así como la inducción de la expresión de varias moléculas como CD80, CD86, ICAM-1, MHC-II y CD40, la expresión de Fas y su ligando, además de Bcl2 y Bcl_{XL} (59). La transducción de señal mediada por CD40 puede variar dependiendo del estado de diferenciación celular (60), y el tipo celular. Uno de los modelos mas ampliamente reconocidos en la señalización mediada por CD40 es su trimerización, la cual puede ser inducida por la unión con CD154 o puede ocurrir de manera independiente (61). CD40 contiene secuencias consenso que pueden actuar como cinasas o unir cinasa. Por lo que después de su trimerización la región citoplásmica de CD40 recluta TRAFs, los cuales actúan como un puente de comunicación entre CD40 y la cascada de cinasas. Las proteínas TRAFs activan la vía de las MAPKs

(MEK1/2-p44/p42, p38) la vía JNK/c-jun y la cascada de NF- κ B. También se sabe que CD40 es capaz de activar al proto-oncogen Ras así como la vía de JAK/STAT. P38 MAPK es fundamental para la inducción de proliferación de linfocitos B, expresión de CD54 y activación de NF- κ B (Figura 1) (62).

El proto-oncogene *pim-1*, que codifica para una treonina-serina cinasa, es blanco de la señalización de CD40 (63) y promueve la supervivencia y proliferación de linfocitos B de manera dependiente de la activación de NF- κ B. También existen reportes que indican que la activación de p38 MAPK mediada por CD40 regula la producción de IL-10 en linfocitos B, y monocitos y de IL-12 en células dendríticas (64). Por otro lado, la familia de las cinasas Src (particularmente Lyn y Syk) son activados por la interacción CD40-CD154 en células de microglia resultando en la activación de MEK1/2p44/p42 (65)



III.3. Estructura de CD40 y su ligando.

Varios trabajos realizados con diferentes anticuerpos anti-CD40 muestran que dependiendo del sitio de unión a ciertas regiones de CD40 es más eficiente para inducir señalización, lo que puede suceder debido a los cambios conformacionales inducidos por la unión del anticuerpo (66). Lo cual indica que parte de la señalización inducida por la interacción CD40/CD154 es dependiente de la conformación presente al momento de la interacción CD40/CD154.

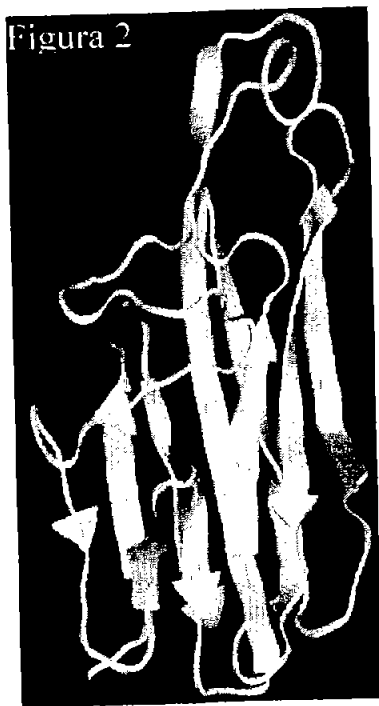
CD40 es una glicoproteína de tipo I, miembro de la familia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-R), la cual también incluye moléculas con diversas funciones como CD27, CD30, OX40, RANK, LT- β R, Fas, TNFR1 y TNFR2 (67). CD40 contiene 277 aminoácidos, donde 19 aminoácidos de la región amino terminal son predominantemente hidrofóbicos, conteniendo una secuencia señal de secreción. El dominio extracelular está compuesto de 193 aminoácidos que incluyen 22 residuos de cisteína, dos sitios potenciales de glicosilación (N153 y N180) y una secuencia líder de 21 residuos. CD40 está anclado a la membrana por un dominio hidrofóbico transmembranal de 22 residuos y un dominio citoplasmático de 62 aminoácidos (68). El gene *cd40* humano está localizado en el cromosoma 20q11-q13.

La función de CD40 se controla mediante mecanismos postranscripcionales y postraduccionales (69), se han identificado cinco isoformas generadas por "splicing" alternativo. El CD40 tipo I es la forma funcional, pues contiene el dominio citoplasmático que es capaz de transducir señal. La forma tipo II carece del dominio citoplásmico asociado a la membrana y por lo tanto inhibe la transducción de señal de CD40 en la superficie celular. Las isoformas III y IV de CD40 contienen un dominio citoplasmático incapaz de transducir señal y presentan la actividad principal de inhibición funcional de la isoforma tipo I de CD40. CD40 también puede encontrarse como un complejo hetero-multimérico en la superficie celular (8). La producción de CD40 soluble puede estar regulada por la interacción de CD40 con CD154 en la superficie de los linfocitos B lo que induce un incremento en la secreción de CD40 soluble y una disminución en la cantidad de CD40

unido a la membrana (70). La producción de CD40 soluble es un proceso activo de corte proteolítico por TACE (miembro de la familia de ADAM, Enzima convertidora de TNF- α) o una desintegrina asociada a MP (metaloproteinasa). Se conoce poco sobre la regulación transcripcional de CD40, sin embargo Nguyen y Benveniste han reportado que depende de STAT-1 y Ets en células estimuladas con IFN- γ (71), en estas células STAT-1 α coopera con el factor de transcripción PU.1 y con Spi-B, el cual se une directamente al promotor del CD40 para activar su expresión. Por otro lado, se ha descrito que el promotor de CD40 contiene cuatro sitios de unión para NF- κ B (65;72). En macrófagos la regulación transcripcional de CD40 es mediada por el factor transcripcional Sp1 mientras que en células estimuladas con LPS la inducción de CD40 es regulada por NF- κ B, en estas células la regulación por Sp1 es inhibida por un mecanismo desconocido de fosforilación (73).

CD154 humano es una proteína transmembranal tipo II que contiene 261 aminoácidos, con un dominio citoplasmático de 22 aminoácidos, un dominio transmembranal de 24 aminoácidos y un dominio extracelular de 215 aminoácidos, el cual contiene un sitio único potencial de glicosilación. La estructura de la región de CD154 parecida al TNF (forma soluble que comprende la región G116 a la L261), fue analizada por cristalografía de rayos-X (74). CD154 es un sándwich de dos hojas β con una topología enrollada que forma una homotrímero simétrico plegado con tres sitios de unión, cada uno creado por la interacción de dos monómeros (**Figura 2**). La organización tridimensional es muy similar a lo descrito para las proteínas de TNF- α y LT α . El cristal de CD154 no muestra la estructura del carbohidrato ni indica que participe en el ensamble, estabilidad o actividad de la proteína. Además, la mutación del sitio único de glicosilación no afecta la unión con CD40 (75).

El gene que codifica para CD154 humano esta localizado en el cromosoma X, posición Xq26.3-Xq27.1 y consiste de 5 exones y 4 intrones, el cuarto y quinto exones codifican la región C-terminal. Las formas solubles de CD154 exhiben algunas de las actividades del CD154 que se expresa en la superficie celular, pues son capaces de inducir proliferación, de cambio de isotipo de inmunoglobulinas y rescate de apoptosis de linfocitos B (76). Se ha detectado una forma soluble biológicamente activa de CD154 en el sobrenadante de cultivos de linfocitos T humanos, que es el resultado del procesamiento intracelular proteolítico de la forma completa de CD154 (77). La función biológica *in vivo* de esta forma soluble de CD154 no es muy clara, aunque se ha establecido que esta proteína incrementa la proliferación de linfocitos B de sangre periférica, además el entrecruzamiento de esta forma soluble con un anticuerpo aumenta su actividad biológica (78). Por otro lado, se cree que el aumento en la expresión de CD154 soluble está relacionado con diferentes tumores sólidos como en el caso de pacientes con cáncer pulmonar, los cuales presentan niveles elevados de CD154 en suero (79).

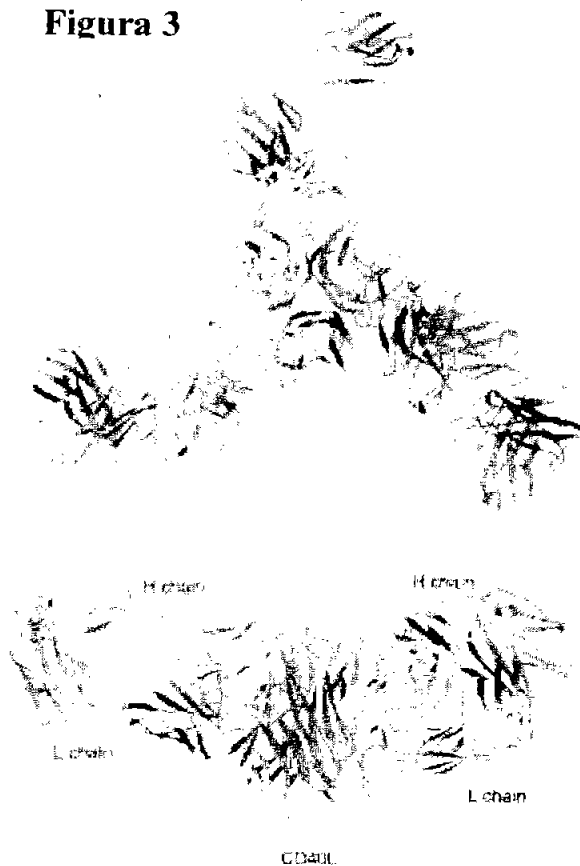


La expresión de CD154 en linfocitos T activados es transitoria y regulada (80), es rápida pues aparece 1 a 2 horas después de la activación y alcanza su máximo después de 6 a 8 horas sin requerir síntesis de proteínas *de novo*, lo que sugiere fuertemente que CD154 se encuentra preformado en la célula. La expresión es intrínsecamente transitoria, se pierde gradualmente y existen mecanismos adicionales para su regulación que comprenden endocitosis mediada por su receptor y degradación lisosomal, la presencia de CD40 soluble que se une a CD154, procesamiento proteolítico y regulación de RNAm de CD154. La expresión de CD154 en linfocitos T *in vitro* se induce mediante fitohemaglutinina (PHA), forbol miristato acetato (PMA) más ionomicina,

anticuerpos anti-CD3 y anti-CD2 (80). Sin embargo, se desconoce la señal fisiológica que regula a CD154 en otros tipos celulares, aunque en linfocitos B, mastocitos y basófilos se ha logrado la regulación de CD154 por el tratamiento con PMA más ionomicina y la activación por trombina en el caso de plaquetas humanas (21).

Aunque aún no se establecen las estructuras cristalográficas completas de CD154, CD40 y del complejo CD40/CD154, la estructura cristalográfica de un fragmento extracelular de CD154 (74) confirma que las moléculas forman un trímero con un plegamiento similar al que presentan otros miembros de la familia del TNF, pero con diferencias en las asas, incluyendo las que se unen a CD40. Sin embargo, se han descrito las estructuras

Figura 3

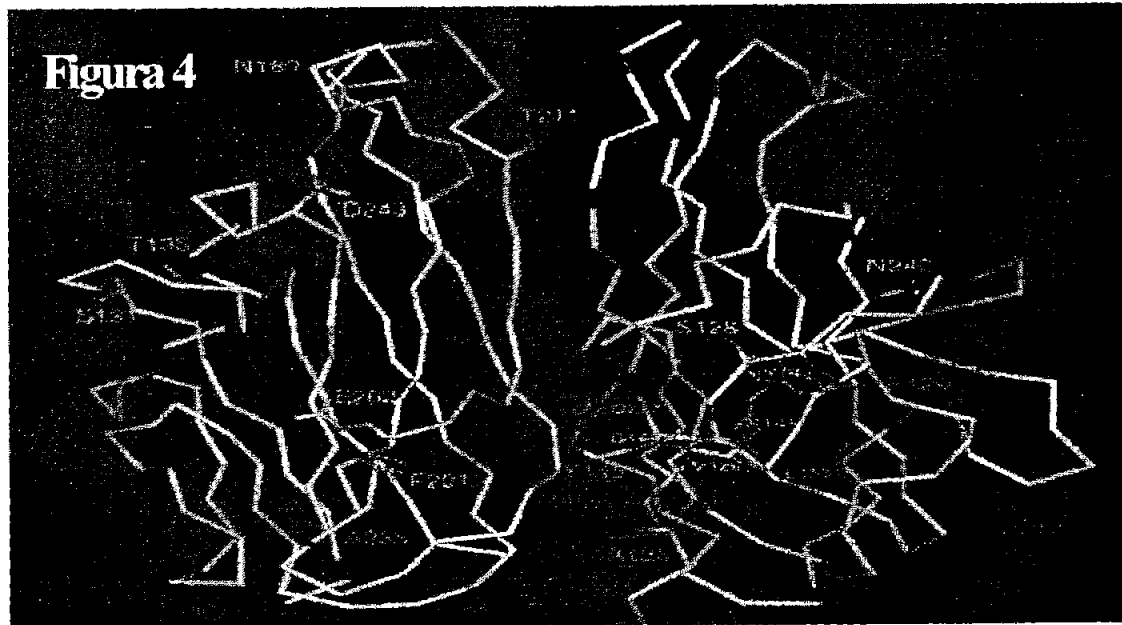


cristalográficas de rayos X de las moléculas TNF- α , TNF- β y el complejo TNF/TNFR (81). Por su homología con CD40 y CD40L, estas estructuras han permitido elaborar los modelos tridimensionales de la región extracelular de CD154 (82), de CD40 y del complejo CD40/CD154 (75;83;84). Estos modelos predicen que CD154 forma un trímero y que CD40 se une al trímero de CD154 interactuando entre dos monómeros; de manera similar a la unión TNF/TNFR, este modelo propone que cada trímero de CD154 es capaz de unir tres moléculas de CD40 (Figura 3) (81). La identificación de regiones de CD154 que hacen contacto con CD40 proviene de la

comparación y alineación con el TNF y la linfoxina, de datos cristalográficos,

mutagénesis sitio dirigidas, análisis de secuencias de pacientes con síndrome de Hiper-IgM ligado al X y de la cristalografía de CD154.

El análisis de la secuencia de CD154 en pacientes con HIGMX-1, ha permitido la identificación de varios aminoácidos involucrados en la unión con CD40 (**Figura 4**). Estos



aminoácidos han sido identificados por mutagénesis sitio dirigida, de acuerdo a los modelos cristalográficos de TNF- α /TNFR, sugiriendo que al menos tres regiones formadas por dos monómeros adyacentes interactúan con CD40, específicamente los aminoácidos K143, Y146, R203 y Q220 (84). Por otro lado, tres diferentes fracciones protéicas recombinantes de CD154 han proporcionado información adicional de la interacción de CD154/CD40. Un fragmento soluble de 29 kDa que incluye los residuos Y145-L261, fue capaz de inducir proliferación y cambio de isotipo en linfocitos B provenientes de pacientes con HIGMX-1, cuando fué administrado en combinación con IL-4 o IL-10 (85). Otro fragmento de 18 kDa que comprende del aminoácido E-108 al aminoácido L-261, fue capaz de formar trímeros, unir soluble CD40 e inducir proliferación, diferenciación y rescate de apoptosis de células B. Finalmente un fragmento de 14 kDa que incluye los residuos S149-L261 fue capaz de unir CD40 pero no fue funcional. Todas estas observaciones sugieren que los aminoácidos

que van de W140 a S149 son esenciales en la interacción con CD40, lo cual es consistente con la hipótesis de que la estructura trimérica es necesaria para la función de CD154.

Como ya se mencionó, al menos tres isoformas de CD154 están presentes en la superficie de linfocitos T, una proteína completa de 39 kDa y otras dos más cortas de 31 y 18 kDa, las cuales son originadas por la actividad proteolítica y son asociadas como heterotrimeros con la isoforma de 39 kDa. El significado funcional de estos homotrimeros de la isoforma de 39 kDa y heterotrimeros con las isoformas de 31 kDa se desconoce. Las principales moléculas en la superficie son homotrimeros y heterotrimeros de la isoforma de 39 KDa con la 31 KDa, los cuales son biológicamente activos (69).

CD154 se agrupa de manera similar a otros receptores de superficie celular, moviéndose a través de la membrana celular en balsas lipídicas. como una condición para su enlace con CD40. Por lo que es razonable conjeturar que diferentes grados de agrupamiento pueden determinar diferentes grados o clases de señalización (34). Las diversas actividades biológicas de diferentes anticuerpos monoclonales contra CD154 o CD40 son consistentes con esta predicción, y sugieren que una proteína de fusión que contiene una región de CD154 que interactúe con CD40, pudiese agrupar CD40 y presentar actividad biológica (66).

III.4. Inmunoterapia empleando CD154.

Contrariamente a lo que sucede en linfocitos B normales, CD154 inhibe el crecimiento de linfocitos B malignos (86;87). La ligación de CD40 en células neoplásicas de glándula mamaria, ovario, cervix, vejiga, pulmón y epitelio escamoso produce una inhibición directa del crecimiento, pues se bloquea el ciclo celular e induce apoptosis (63;88;89). Es por ello que se ha sugerido que la inmunoterapia mediante CD154 puede ser una alternativa en el tratamiento de las neoplasias que expresan CD40. Por otro lado, la administración de CD154 recombinante podría corregir los defectos vinculados a CD154 en el síndrome de hiper-IgM (90) y también podría ser útil en otros padecimientos que implican una

interacción desregulada CD40/CD154, como en algunas formas de autoinmunidad. En los casos de autoinmunidad el tratamiento se fundamenta en la administración de formas solubles de CD40 que bloquean la interacción intercelular mediada por la unión CD40/CD154, aunque también es posible utilizar anticuerpos antagonistas o neutralizantes. Sin embargo, la terapia basada en la administración sistémica de CD154 posee el riesgo potencial de inducir procesos inflamatorios sistémicos o autoinmunidad.

CD154 es capaz de inducir un incremento en la expresión de CD80 y CD86, de moléculas de adhesión y de MHC-II en células neoplásicas, las cuales son capaces de activar CTLs a través de CD28 (91). Además, CD154 activa células dendríticas, e induce la secreción de IL-2 en linfocitos T (92) y de moléculas coestimuladoras, factores que se requieren para la presentación de antígenos y la generación de la inmunidad antitumoral. Otro posible mecanismo antitumoral en linfomas B relacionado con la interacción CD40/CD154 consiste en apoptosis mediada por la vía Fas/Fas-L. Aunque los linfocitos B malignos expresan Fas de manera variable, la interacción con CD154 induce y eleva su expresión incrementando la sensibilidad de estas células a la señal de muerte mediada por FasL (93).

La administración de DNA que codifica para CD154 constituye otra alternativa para la activación de la respuesta inmune contra células B tumorales (94-96). El DNA puede ser administrado mediante el empleo de vectores virales o bacterianos atenuados (97), lo que resulta en el incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras, que a su vez inducen CTLs capaces de eliminar linfocitos B tumorales (98). También la administración de linfocitos B tumorales autólogos modificados mediante adenovirus para sobre-expresar CD154, ha demostrado estimular la respuesta de linfocitos T contra linfocitos B tumorales no transformados con adenovirus en pacientes con leucemias (95). En estos pacientes se observó una disminución importante en el número de células tumorales, así como del tamaño de los ganglios linfáticos con la activación de linfocitos T reactivos ante las células leucémicas, aunque la mejoría clínica fue limitada. Otros sistemas de activación consisten en la cotransfección de plásmidos que expresen CD154 y alguna citocina como IL-12 o

GM-CSF (99), o de moléculas coestimuladoras como CD80. También se han desarrollado sistemas que emplean moléculas adyuvantes como secuencias CpG, junto con anticuerpos anti-CD40 (100). Todos ellos, sin embargo, son más eficientes cuando se utilizan en conjunción a un antígeno tumoral específico (101).

La interacción prolongada entre CD40 y CD154 está implicada en la inducción de padecimientos autoinmunes como artritis reumatoide (102), glomerulonefritis en el lupus murino (103), miastenia autoinmune (104), encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (105) y en general en aquellos padecimientos que involucran la generación de autoanticuerpos, aunque también se ha relacionado con un incremento de reacciones alérgicas (106;107). El bloqueo de la interacción CD40/CD154 inhibe casi por completo la fase aguda de EAE en ratones y monos tíñ (105;108); por ello, se han empleado anticuerpos anti-CD40 para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico en estudios de fase I (109). Los anticuerpos anti-CD154 causan inmunosupresión transitoria, propiedad que ha sido utilizada para la inducción de tolerancia a transplantes (110;111) de órganos como riñones (112) e hígado (113).

La interacción de CD40/CD154 induce el crecimiento de linfomas relacionados al VIH, posiblemente por el incremento de vascularización y por activación de NF- κ B, el cual estimula la replicación de VIH (114). Por ello, se está tratando de explorar la inmunoterapia con la finalidad de inhibir esta interacción (115). Sin embargo, la inmunosupresión por la regulación de la interacción de CD40 pudiese favorecer la persistencia del VIH.

III.5. Porinas.

La envoltura de las bacterias Gram negativas consiste de tres capas, la membrana citoplasmática, la peptidoglicana y la membrana externa. La membrana externa tiene el aspecto trilaminar típico de las membranas biológicas. Esta estructura le confiere a la

bacteria gran hidrofobicidad y la protege de los mecanismos de inmunidad inespecífica del huésped. Las porinas constituyen su componente más abundante, pues pueden llegar a constituir hasta un 2% de la proteína total (116).

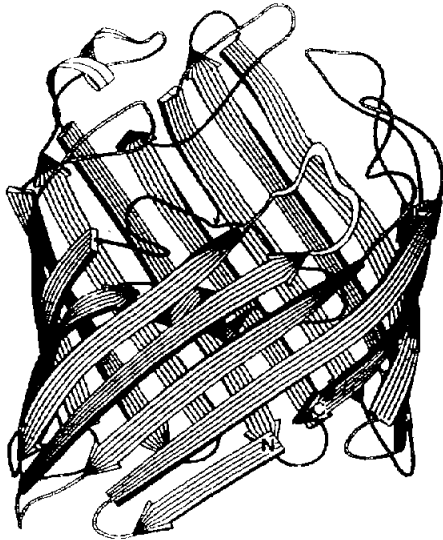


FIGURA 4. Esquema de la estructura de la porina OmpF. Tomado de Cowans 1992 (1)

Aunque se han descrito varias porinas, las más estudiadas en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium son OmpC, OmpD, OmpF y PhoE. OmpD es la proteína más abundante en la membrana externa (117) y están presentes en cantidades de 1×10^5 a 2×10^5 de porinas por célula (116). Las características generales de OmpF y OmpC de *Escherichia coli* se pueden generalizar al resto de las porinas de otras enterobacterias y debido al alto grado de homología funcional y

estructural entre estas proteínas, se cree que evolucionaron de un gene ancestral común. El gene que codifica para OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi ha sido aislado y secuenciado (118;119) y, aunque ya se ha reportado una forma cristalizada de esta porina, su estructura no se ha determinado ya que el cristal es muy inestable, pues el cristal presenta un decaimiento muy rápido (120).

Estas proteínas tienen pesos moleculares de 36 a 38 KDa, forman canales llenos de agua que permiten la difusión de pequeñas moléculas dentro de la célula. Se ensamblan como trímeros en la pared celular (116) en la cual cada tres barriles ensamblados forman tres separados canales. El monómero de las porinas es un polipéptido de 336 residuos en promedio, este polipéptido tienen forma cilíndrica, semejante a un barril (121-126). La cristalografía de OmpF (124-126) y PhoE (1) muestran que el barril está formado por 16 regiones de hojas β plegadas anti-paralelas enlazadas en sus extremos por horquillas y por

largas asas con algunas α -hélices intercaladas. El cilindro se forma al cerrarse las estructuras β de manera pseudocíclica, mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja β -16 y el extremo amino de la hoja β -1 (Figura 4).

En el centro del barril se forma un canal inclinado con respecto al eje longitudinal, la entrada del poro está restringida por las asas largas y dispuestas que se extienden hacia el centro y la salida del poro al espacio periplásmico se define por las vueltas β . El mayor número de diferencias en la secuencia proteica entre una y otra porina se localiza en estas asas expuestas al medio externo y su estructura determina el tamaño de entrada del poro (124-126). Los monómeros de las porinas se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse a la membrana externa y formar trímeros (121). El entrecruzamiento de las regiones hidrofóbicas de las vueltas β -15 y β -16 contribuye en la formación del trímero. Los diez residuos carboxilo de la región β -16, en particular el último (una fenilalanina muy conservada en las porinas), son esenciales para el correcto ensamblaje y la estabilidad de la porina (127;128). La estructura de las porinas presenta una gran estabilidad en presencia de detergentes como las sales biliares y el SDS, y son altamente resistentes a la acción de algunas proteasas (124-126). Estas porinas han sido seleccionadas como acarreadores de antígenos exógenos, ya que tienen la capacidad de inducir respuestas humorales y celulares en ratones y seres humanos (129-134), además de tener sitios permisivos para la inserción de antígenos foráneos (135;136).

El ensamble de las porinas inicia con el corte proteolítico de una secuencia señal en la región amino terminal, que da origen a un monómero soluble de esta proteína. Este monómero oligomeriza rápidamente en un trímero sensible al calor llamado trímero metastable, el cual lentamente madura formando trímeros resistentes a la actividad de las proteasas y a las altas temperaturas (137). Las porinas puede formar trímeros a partir de monómeros desnaturalizados sin la necesidad de alguna proteína accesoria *in vitro* (138), pero el ensamble *in vivo* depende de varios factores de plegamiento, entre los cuales se

encuentran las proteínas periplásmicas SurA y FkpA. Estas proteínas catalizan la isomerización cis-trans peptidil-prolil (139;140). También la proteína Skp, participa en el ensamble de la OmpC actuando como una chaperona (141). Los componentes no proteicos, como los fosfolípidos y lipopolisacáridos que colocalizan con las porinas en la membrana externa, también son de importancia para mantener la estructura cuaternaria de estas proteínas (142). Por otro lado, las proteasas encontradas en el contorno periplásmico son de gran importancia para asegurar el correcto ensamblaje de las porinas, así por ejemplo la proteasa periplásmica DegP es la más estudiada en la regulación de la expresión de porinas (143) y está implicada en la eliminación de las proteínas no ensambladas correctamente (144)

III.6. Expresión de péptidos en la superficie de enterobacterias.

Actualmente es posible modificar diversas proteínas de enterobacterias utilizando métodos de ingeniería genética con el propósito de expresar péptidos (a los que se les conoce como "pasajeros") en la superficie bacteriana. Para ello, entre otras estrategias se han utilizado como "vectores" a las Proteínas de Membrana Externa (PMEs), ya que estas proteínas tienen regiones hidrofílicas muy extensas formadas por una región β -extendida, y sitios "permisivos" donde es posible insertar secuencias de aminoácidos sin alterar la estructura y función de la proteína. La metodología de inserción de péptidos foráneos en las porinas no solo permite realizar estudios topológicos de estas proteínas, sino que también ha sido utilizada para la elaboración de candidatos de vacunas, para generar anticuerpos polivalentes monoespecíficos útiles para diagnóstico, para buscar de péptidos con actividades biológicas (145-150). Las PMEs utilizadas con este fin han sido LamB, PhoE, OmpA, TraT y OmpC (127). La proteína MalE, por ejemplo, permite la inserción de 55 a 65 residuos de aminoácidos sin afectar la función biológica de la proteína.

La localización de la proteína que acarrea la secuencia foránea en los diferentes compartimientos de la bacteria acarreadora determina el tipo de respuesta inmunológica.

Cuando los epitopos se expresan en LamB, que se exporta a la membrana de *Escherichia coli*, se obtiene respuesta de anticuerpos timo independiente, en cambio cuando se expresan en MalE, que permanece en el espacio periplásmico, la respuesta de anticuerpos es dependiente de linfocitos T (128;151). Sin embargo, se ha logrado inducir anticuerpos neutralizantes contra poliovirus (152;153) o contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (154) utilizando LamB o MalE de *Escherichia coli*. También se ha logrado la expresión de epitopos en la superficie de la porina PhoE de *Escherichia coli* (155), OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi (136) y OprF de *Pseudomonas aeruginosa* (156). Al insertar péptidos de rotavirus de 18, 160 y 252 residuos en la porina OmpC de *E. coli* se encontró que el epitopo de 160 residuos fue reconocido por un anticuerpo monoclonal en ELISA demostrando que la extensión de la secuencia foránea es un factor determinante en su inmunogenicidad (136). También se ha utilizado como acarreador de péptidos de ovalbúmina para modular la respuesta inflamación alérgica en un modelo murino (157).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La interacción de CD154 (que se expresa en células T activadas) con CD40 (que se encuentra la superficie de células B), es crucial en la activación y proliferación de ambas células. Se ha determinado que CD154 tiene alta homología estructural con las proteínas de la familia del TNF. El modelo de interacción tridimensional de CD154 con CD40 ha permitido predecir los sitios de contacto entre ambas proteínas. Los amino ácidos en las posiciones K143, R203 y R207 de CD40L son fundamentales para la interacción con CD40, pero se desconoce si están involucrados en la activación de células B y macrófagos. El segmento W140-S149 es especialmente interesante porque es continuo y porque solo las formas truncadas solubles de CD40L que lo contienen, son capaces de inducir activación de células B. Considerando que es posible expresar péptidos heterólogos en sitios permisivos de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, es razonable pensar que una porina bacteriana (OmpC) que contenga el segmento W140-S149 de CD40L sería capaz de unirse a CD40 y que pudiese inducir activación de linfocitos B.

V. HIPÓTESIS.

La expresión de una de las regiones de CD154 que contiene los aminoácidos esenciales para la interacción con CD40 (W140-S149) en la asa cinco de la porina OmpC es capaz de unirse e inducir la activación de células B por la vía CD40-CD154.

VI. OBJETIVOS.

General.

-Identificar y analizar la región de CD154 capaz de interactuar con CD40 e inducir la activación de células B, mediante la construcción de una proteína híbrida OmpC-gp39.

Particulares.

-Insertar en la porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi una secuencia que codifique para una de las regiones de CD154 posiblemente capaz de interactuar con CD40.

-Expresar y purificar la proteína híbrida OmpC-gp39.

-Evaluar la actividad biológica de la proteína híbrida OmpC-gp39 en células B.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VII.1. Cepas bacterianas.

Escherichia coli DH5 α TM. (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(r_k, m_k⁺) *phoA* *supE44* λ *thi-1* *gyrA96* *relA1*.

Escherichia coli UH302. OmpC, OmpF (158;159).

Las cepas bacterianas transformadas con plásmidos pST13 y pST13-gp39 fueron cultivadas en cajas de Petri con medio Luria-Bertani (LB)(Gibco) a 37°C con 100 µg /ml de ampicilina (Sigma, St. Louis, MO).

VII.2. Plásmidos.

pST13. Contiene el gene que codifica para OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi (Proporcionado por el Dr. Felipe Cabello. New York Medical College Valhalla, New York 10595) (119).

pST13-gp39 contiene una substitución en la región que codifica para el asa cinco de la porina OmpC por la secuencia que codifica para el péptido Try140-Ser149 de CD154 (La construcción se reporta en este trabajo)

VII.3. Ingeniería genética.

La manipulación de DNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook (160).

VII.3.1. Purificación y cuantificación de ADN.

VI.3.1a Cuantificación de ADN.

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

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

VII.3.1b. Purificación de ADN.

El plásmido pST13 fue purificado a partir de *E. coli*-UH302-pST13 utilizando un sistema de purificación de ácidos nucleicos (CONCERT™Rapid Plasmid Midiprep System, GIBCO BRL). El producto de la PCR fue purificado utilizando columnas (GIBCO, BRL), posteriormente fue digerido con la enzima KpnI (Roche).

VII.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa.

El gene de la porina OmpC fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa a partir del vector pST13. Se obtuvo un gene híbrido por fusión mediante el empleo de dos pares de iniciadores que flanquean el gene de *ompC* (118)(*ompC*1 5'ATG AAA GTT AAA GTA CTG3' y *ompC*2 5'CTG GTA AAC C AG ACC CAG3') y otro par de iniciadores internos que contienen la secuencia del asa cinco del gene *ompC* (negrillas) y la secuencia de inserción del fragmento del gene de *cd154* (118;161) (*gp39I* 5'TCC TGG GCT GAA AAG GTTACT ACA CTA TGT CCC TGT ATG GTA ACG GCG AT3' y *gp39II* 5'GGA CAT AGT GTA GTA ACC TTT TTC AGC CCA GGA CTG ATG GGG CAG TAC GTT T3'). La amplificación se realizó en un termociclador (Robocycler, Stratagene), bajo las siguientes condiciones:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
ADN	0.1	µg
Iniciadores	50	pg
Mezcla de dNTPs	0.2	Mm
MgCl ₂	1.3	Nm
Taq DNA polimerasa	1.5	U
Amortiguador de reacción 10X	10	µl
Agua inyectable c.b.p.	100	µl

Número de Ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	5				
36	94	45 seg	56	45 seg	72	1.5
1					72	5

VII.3.3. Reclonación del gene quimérico.

El gene quimérico se purificó por el método de "Gene Clean®", y se digirió con la enzima *KpnI* 3 h a 37°C y fue reclonado en el vector inicial pST13 digerido con la enzima *KpnI* purificado en las mismas condiciones que el gene quimérico y se posteriormente se transformo en la cepa *E. coli* UH302 (158), para su expresión y propagación.

VII.3.4. Caracterización del gene quimérico.

La construcción fue verificada por el empleo de la PCR usando un par de iniciadores internos (gp39III 5'GCT GAA AAA GGT TAC TAC3' y gp39IV 5'GTA GTA ACC TTT TTC AGC3'). La mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
ADN	0.1 µg
"primers"	50 pg
Mezcla de dNTPs	0.2 Mm
MgCl ₂	1.3 Nm
Taq DNA polimerasa	1.5 U
Amortiguador de reacción 10X	10 µl
Agua inyetable c.b.p.	100 µl

Número de Ciclos	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	5				
36	94	45 seg	56	45 seg	72	1.5
1					72	5

VII.4. MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

VII.4.1. Purificación de la proteína de fusión OmpC-gp39 y OmpC recombinante.

La purificación se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Arockiasamy (162). Brevemente, la purificación de las porinas se realizó a partir de un cultivo de 4 litros en caldo Luria (Gibco BRL) de las cepas de *E. coli* UH302 transformadas con pST13 que contiene el gene de la porina OmpC o bien con el vector que contiene el gen quimérico *OmpC-gp39*, incubado por 14 h a 37°C y 200 rpm. Las células fueron centrifugadas a 7,000 rpm por 30 min a 4°C (Rotor GSA, centrifuga Sorvall RC 5B plus). La pastilla fue lavada dos veces con solución salina al 0.9% y centrifugada a 7,000 rpm por 30 min., la pastilla final fue guardada toda la noche a -20°C (la pastilla fue de 17 g para la UH302 pST13 y de 11 g para la UH302pST13-gp39). La pastilla se descongeló a 4°C y se resuspendió en una solución de Tris-HCl 0.1M (pH 7.2) y sometida a una prensa French a 20,000 psi, con un flujo de 1ml por min. Las células lisadas fueron centrifugadas a 11,000 rpm (rotor SS34) por 10 min a 4°C para remover las células no lisadas. El sobrenadante se centrifugo a 30,000 rpm por 30 min a 20°C usando una ultra centrifuga Beckman XL-100K (rotor 70.1 Ti). La pastilla que contenía las membranas crudas fue resuspendida en 100 ml de la

solución I (Tris-HCL 50mM, pH 7.7 MgCl₂ 10mM y 2% de SDS) y se incubaron a 37°C por 18 h en agitación. La suspensión se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 20°C, la pastilla fue resuspendida en 28 ml de la solución II (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 5mM, SDS 1% y 0.05% de β-ME, adicionado justo antes de su uso). Esta suspensión fue incubada a 37°C por 2 h y posteriormente centrifugada a 12,000 rpm por 30 min a 20°C. La pastilla fue resuspendida en 9 ml de la solución III (Tris-HCl 50mM, EDTA 5 mM, 0.2% de SDS, NaCl 0.4M y 0.05% de β-ME). La suspensión se incubó por 2 h a 37°C y se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min a 20°C. El sobrenadante rico en porinas fue recolectado y se guardó a temperatura ambiente. El paso anterior se repitió por lo menos cinco veces con 4ml de la solución III. Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE y dializadas contra una solución que contienen 10 mM de NaHCO₃ y 10 mM de HEPES a 25°C por 20 min (163). Las proteínas se esterilizaron por irradiación 15 min. (Irradiador Gammacel) y se almacenaron a 4°C.

VII.4.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteína fue determinada por el método descrito por Bradford (164) o empleando los reactivos "BCA-Protein Assay Reagent" (PIERCE) (165)

VII.4.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las muestras de proteínas purificadas fueron resuspendidas en amortiguador de muestra (Tris 0.125 M pH 8.8, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%), y hervidas a 92°C por 10 min, también se analizaron muestras sin hervir. La electroforesis se realizó a 35 mA con corriente constante de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (166), en una cámara miniPROTEAN 3 Cell en geles de 1 mm de espesor. El gel superior contenía 2.5% de acrilamida, 0.13% de bisacrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.125 M pH 6.8. El gel separador contenía 12% de acrilamida, 2.5% de bisacrilamida, 0.19% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.35 M pH 8.8. Una

muestra de 20µl que contenía 10µg de proteína fue aplicada en cada pozo. Estándares de peso molecular preteñidos (BIO-RAD) fueron usados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posterior al corrimiento, los geles se tiñeron durante 1 h en una solución de azul de Coomasie R-250 al 0.25% en metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Se destiñeron empleando una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85) hasta que el fondo del gel fue transparente.

VII.4.4. Inmunoelectrotransferencia (Western Blot).

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa NitroBind (MSI, Westboro, MA), a 400 mA por 1.5 h usando una cámara Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) conteniendo una solución de transferencia (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina, y 20% metanol vol/vol, pH 8.3), de acuerdo al método de Towbin (167). Los sitios libres de la membrana fueron bloqueados con una solución al 5% de leche en PBS por 1h a 37°C y después se lavó tres veces con PBS y otras tres veces con PBS Tween-20 al 0.1% (TPBS), posteriormente se puso en contacto con un “cocktail” de anticuerpos monoclonales anti-OmpC (Donado por el Dr. Felipe Cabello) diluido 1:5000 en PBS que contenía 5% de leche, por 1h a 37°C, y se procedió a lavar en las condiciones mencionadas arriba y se adicionó el segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa (HRP, Sigma) diluido 1:5000, durante 45 min. La reacción se reveló con β-4-Cloro naftol-H₂O₂. Todo esto se realizó a temperatura ambiente.

VII.4.5. Conjugado de la proteína OmpC-gp39 y OmpC a isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Quinientos µg de las proteínas OmpC-gp39 y OmpC fueron conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC: Sigma), por el método de Goding (168). Brevemente, se preparó una solución de la proteína de 2mg/ml en 0.1M de carbonato de boratos pH 9.0, se disolvió la marca FITC en DMSO 1mg/ml. Por cada ml de la solución de proteína se adicionó 50 µl de la solución de FITC. La adición fue lenta en alícuotas de 5µl y se agitó levemente entre cada adición. Se dejó la reacción en la oscuridad por 1h a 4°C. Se eliminó

la marca FITC residual por centrifugación en Centricon® a 4500g por 15 min. El conjugado se guardó en la oscuridad a 4°C.

VII.4.6. Ensayo de Unión de CD40/OmpC-gp39.

VII.4.6.1. Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA).

Se realizó de acuerdo al método de descrito por Mazzei (85;169). Tres diferentes variantes de ELISA fueron empleadas:

a) Ensayo de inhibición.

Se recubrieron placas de 96 pozos (3590, Costar) para microtitulación con 2 µg/ml de una proteína de fusión recombinante CD40-Fc (Alexis, Co. rCD40-Fc, 522-016-C050) diluida en PBS 0.2 M pH 7.4 en un volumen final de 100 µl por pozo. Se incubó toda la noche a 4° C. Las placas fueron bloqueadas con 100 µl de PBS con 1% de suero fetal bovino (Vol/Vol) y 2% de albúmina sérica bovina (Vol/Vol) (FBPBS), por 2 hr. A 37° C, posteriormente las placas fueron incubadas con una proteína recombinante CD154 humana (rhCD154. Alexis, Co. 522-015) diluida en PBS por 1 hr a 37° C. La inhibición se llevo a cabo preincubando la proteína recombinante CD40-Fc con concentraciones crecientes de la proteína OmpC, OmpC-gp39, o un anticuerpo policlonal anti-CD40 (0.8-50 µg/ml). Posteriormente las placas fueran incubadas con un anticuerpo anti-CD154 (Alexis, Co. ANC-353-020) y revelado con un anticuerpo anti-ratón IgG conjugado a peroxidasa (HRP), diluido 1:1000 por 1hr a 37° C. Se adicionó como substrato *o*-fenilendiamina H₂O₂ de un stock de 6 mg/12ml, para preparar la mezcla se empleó una solución de sustrato (Sustrate Buffer R8 Sanofi Diagnostics Pasteur). Se detuvo la reacción a los 10 min de incubación adicionando 50µl por pozo de H₂SO₄. Se determinó la absorbancia a 492 nm usando un lector de ELISA (Beckman DU600). Entre cada paso se realizaron 4 lavados con TPBS.

b) Ensayo de unión OmpC-gp39-CD40.

Se recubrieron placas de 96 pozos con diluciones seriadas de OmpC u OmpC-gp39, la dilución inicial fue de 50 µg/ml (0.4- 50 µg/ml en PBS 0.2 M pH 8.4) en un volumen final de 100 µl por pozo. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4° C, y fueron bloqueadas como se describe arriba. Una proteína de fusión recombinante CD40-Fc fue adicionada a una concentración de 2 µg/ml diluida en 100 µl de BSA-PBS y las placas fueron incubadas por 1 hr a 4° C. Finalmente se adicionó un anticuerpo anti- IgG humano conjugado a peroxidasa (Zymed Laboratories, Inc.) diluido 1:1000 1 hr a 37° C, y se reveló como previamente se describe.

c) Ensayo de competencia.

Se recubrieron placas de 96 pozos con diluciones seriadas de la proteína de fusión CD40-Fc (0.4- 50 µg/ml), incubada con la proteína OmpC u OmpC-gp39 (10 µg/ml) o una mezcla de estas proteínas con rhCD154 (5 µg/ml), posteriormente un “cocktail” de anticuerpos monoclonales contra OmpC, fueron adicionados en una dilución de 1:1000 en BPBS, y revelado con un anticuerpo anti-ratón IgG conjugado a peroxidasa. Finalmente, la competencia entre OmpC-gp39 y CD154 por la unión con CD40 fue evaluada recubriendo placas de 96 pozos con concentraciones crecientes de rhCD154 (0.4- 50 µg/ml), o con una mezcla de rhCD154 y OmpC u OmpC-gp39 (10 µg/ml). Las placas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD154, y reveladas con un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa.

VII.4.6.2. Citometría de Flujo (FACS).

VII.4.6.2.a. Ensayo de unión de OmpC-gp39/CD40 en células Raji.

Cien µl/pozo de una suspensión de células Raji, que contenía 1×10^7 células/ml fueron adicionadas a una placa de 24 pozos (356, Costar), las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las proteínas OmpC-gp39 y OmpC conjugadas a isotiocianato

de fluoresceína (FITC), por 30 min a 37° C. La unión de la proteína OmpC-gp39 fue analizada por citometría de flujo, en un citómetro de flujo FACSVantage SE System (Becton Dickinson, Mountain View, C.A.) y analizado con el Software Lysis II (Ver. 1.1), 5000 eventos de cada una de las muestras fueron analizados. La inhibición fue realizada usando un anticuerpo anti-CD40 (1 µg/ml) o competición con proteínas OmpC u OmpC-gp39 no marcadas (20 µg/ml). Todos los datos fueron analizados usando el programa SPSS para Windows y una $P \leq 0.05$ fue considerada con significancia estadística.

VII.5. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

VII.5.1. Líneas celulares.

La línea de linfoma de Burkitt humana Raji (ATCC no. CCL-86) fue mantenida en medio completo RPMI-1640 como se ha descrito previamente (170-172).

VII.5.2. Purificación de linfocitos B de sangre periférica.

Los linfocitos B de sangre periférica fueron aislados de muestras de sangre de donadores sanos. La purificación se realizó de acuerdo al método descrito en los protocolos de aislamiento de células B (B cell isolation kit MACS, Miltenyl Biotec). Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica por centrifugación en un gradiente de densidad sobre Ficoll Histopaque®. Se eliminaron las burbujas pasando la solución de celular a través de un filtro de nylon de 30µm, las células se contaron en una cámara de Neubauer (Marienfeld) diluidas 1:10 y lavadas con una solución de PBS que contenía 10% de suero fetal bovino y 2mM de EDTA (PBSS). Las células fueron resuspendidas en un volumen final de 10^7 células por cada 60µl. Se adicionó 20 µl del reactivo bloqueador (FcR Blocking Reagent) y 20µl del "cocktail" de anticuerpos conjugados a un hapteno. Se mezcló y se incubó por 10 min a 10°C, las células se lavaron dos veces con 15 volúmenes de PBSS y se centrifugaron para remover el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 80µl de PBSS y se les adicionó 20µl de MACS (Microperlas unidas a un anticuerpo anti-

hapteno), La mezcla se incubó por 15 min a 10°C, y posteriormente se lavaron dos veces con 15 volúmenes de PBS. Las células fueron resuspendidas en 500µl de PBSS y se pasaron a través de una columna BS (MACS 413-04) colocada en el magneto (VarioMACS), con una resistencia de flujo a 20G. La solución fluyente rica en linfocitos B fue colectada. La pureza de los linfocitos B purificados fue evaluada por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CD19 conjugado a PE, la pureza fue de >94% con un contaminante de <4% de células CD3⁺.

VII.5.3. Ensayo de activación de células B humanas.

Células Raji y linfocitos B purificados de sangre periférica fueron estimulados por 18 y 24 h con varias concentraciones (5, 10, 20 y 50 µg/ml) de la proteína de fusión recombinante OmpC-gp39, la proteína OmpC nativa o con un anticuerpo purificado anti-CD40 (1 µg/ml, 5C3 33070D PharMingen), en presencia de 200 U de IL-14. La activación fue evaluada por el incremento en la expresión de las moléculas: MHC-II, CD23 y CD80 (32;173), analizadas por citometría de flujo empleando anticuerpos anti-MHC-II, anti-CD23 y anti-CD80 conjugados a FITC.

VII.5.4. Ensayo de proliferación de células B humanas.

Células B humanas se estimularon por 2 a 4 días a 37 °C y 5% de CO₂, con IL-4 (200U/ml) y varias concentraciones de la proteína de fusión OmpC-gp39, OmpC o el anticuerpo anti-CD40. Seis horas antes de terminar el cultivo se agregó 1 µCi de ³H-timidina (Amersham, Int. Berkshire, England) por pozo. Las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio y la incorporación del material radiactivo se cuantificó en un contador de Centelleo Líquido (Liquid Scintillation Counter, 1450 Microbeta Trilux). Los resultados se encuentran expresados en c.p.m. (174).

VI.5.5. Ensayo de diferenciación de células B humanas.

Células B humanas de sangre periférica fueron estimuladas con IL-4 más un anticuerpo anti-CD40 o la proteína OmpC-gp39 u OmpC, y se determinó la presencia de las inmunoglobulinas IgE e IgG por ELISA como se ha descrito previamente (24;25;175).

VIII. RESULTADOS.

VIII. 1. Construcción y expresión de la proteína de fusión OmpC-gp39.

La región extracelular que comprende los residuos W140 a la S149 del CD154 humano se insertaron en el asa cinco de la porina OmpC de *S. enterica* serovar Typhi y se expresaron en la cepa de *E coli* UH302 carente de porinas. Esta región fue seleccionada basándose en lo siguiente: 1) La estructura cristalográfica del modelo de interacción TNF/TNFR (81), el cual tiene una alta homología con la interacción que presenta CD40/CD154 y muestra dos regiones de TNF, S198-A210 y Y140-M148, que interaccionan con TNFR: 2) La identificación de mutaciones de CD154 en pacientes con el síndrome HIGMX-1 y experimentos de mutagénesis sitio dirigidos, los cuales identifican residuos como: K143, Y145, Y146, R203 y Q220 los cuales son críticos en la interacción con CD40 (75;81;83;84;176). y 3). La descripción de tres fracciones solubles recombinantes de CD154, que incluían los residuos Y45-L261, E108-L261, y S149-L261, las cuales mostraron actividad biológica. Un alineamiento de TNF, LT y CD154 revela que los residuos entre la región W140-S149 de CD154 presentan una alta homología con las otras dos proteínas (Figura. 1A).

A

	116	125	135	145	
TNF=	R T P S U K F Q L V A R V V A N P Q A E G S V L Q			W L R R R A N A L I A	R G V
LT=	T L K P Q I A A N L I G B P S K Q N S L L			W R A N T B R A F L Q D G F	
CD154	G D N P Q L A A H V I S E A S S K T T S V L Q			W R A E K G Y Y T M S K N L	

* * * *

* * * * * *

B



Figura 1. Construcción de la proteína de fusión OmpC-gp39. A) Alineamiento de la secuencia de la proteína CD154 con TNF y linfotoxina (LT). B) Inserción de la secuencia de aminoácidos 140-149 de CD154 en el gene *ompC*. La secuencia de aminoácidos W140-S149 de CD154 fue insertada por PCR en el asa 5 de la porina OmpC de *S. enterica* serovar Typhi, empleando el plásmido pST13 como molde. Una primera ronda de amplificación fue realizada con los "primers" Ompc1/gp39II u Ompc2/gp39I (a). Esta amplificación originó dos fragmentos del gene OmpC en el cual la secuencia de CD154 fue incluida (b). La segunda ronda de amplificación fue realizada empleando ambos productos de ADN como molde con los "primers" Ompc1/Ompc2 (c). Esta amplificación originó un producto de fusión en el cual el segmento de 666-685 pares de bases, fue substituido por la secuencia de CD154 (d, e). El plásmido pST13 y el producto de la PCR fueron digeridos con la enzima *KpnI* (f). El fragmento digerido fue reinsertado en el plásmido pST13 y transformado en la cepa de *E. coli* UH302.

Por lo tanto, la región de CD154 W140-S149 (WAEKGYTMS), fue substituida dentro del asa cinco de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi y expresada en *E. coli*

UH302 cepa carente de porinas. La proteína de fusión fue obtenida mediante la técnica de PCR, en dos diferentes amplificaciones. En la primera amplificación, dos fragmentos del gene de OmpC contenidos en el plásmido pST13 se utilizaron como molde empleando dos “primers” híbridos que contenían las secuencias de CD154 y del asa cinco de OmpC. Esta secuencia fue seleccionada de acuerdo al modelo de predicción descrito previamente (135;177). La primera amplificación generó dos fragmentos (420 y 713 pb) (Figura 2A, Carriles 2 y 3), los cuales fueron fusionados en una segunda amplificación usando los “primers” para el completo gene *ompC* (1113 pb) (Figura 2A, línea 4). El fragmento generado, contiene la secuencia de CD154 en la secuencia del asa cinco de la porina OmpC, la cual fue digerida *KpnI-KpnI* y sustituida por el fragmento *KpnI-KpnI* del plásmido original pST13, originando el plásmido pST13-gp39 (Figura 2B, línea 6). Esta estrategia está representada esquemáticamente en la Figura 1B.

VIII. 2. La proteína de fusión OmpC-gp39 se expresa en *E. coli* UH302.

La cepa de *E. coli* UH302 carente de porinas fue transfectada con el plásmido pST13-gp39. La proteína de fusión OmpC-gp39 fue purificada por el método reportado por Arockiasamy (162), como se describe en Material y Métodos. La pureza de la porina OmpC-gp39 y su disposición homotrimérica fue demostrada por análisis electroforético (Figura 2C). El análisis por electroforesis de la proteína OmpC revela las bandas correspondientes a los pesos esperados 108 kDa para las muestras sin hervir y 36 kDa para las muestras hervidas (Figura 2C, Carriles 1 y 2), demostrando que la porina nativa es capaz de formar trímeros. La proteína de fusión OmpC-gp39 muestra un mayor peso molecular (\approx 40 KDa), pero también es capaz de formar trímeros (Figura 2C, Carriles 3 y 4) como la porina OmpC, datos que correlacionan con trabajos similares en donde se modifica la secuencia de la asa cinco de la porina (157). Un resultado semejante fue obtenido en la inmunoelectrotransferencia revelada con un suero anti-OmpC policlonal

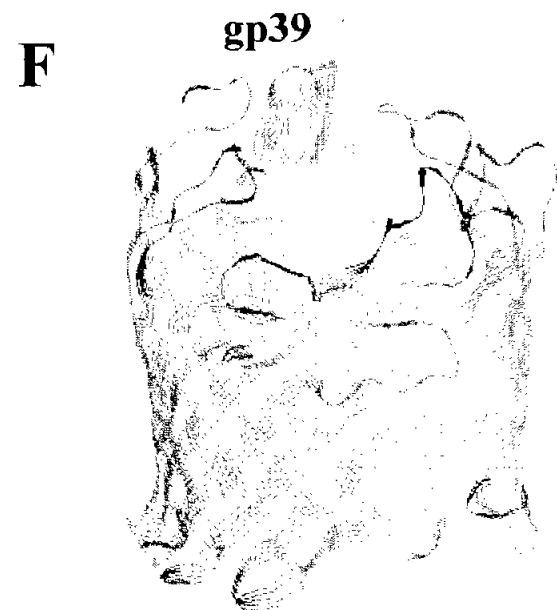
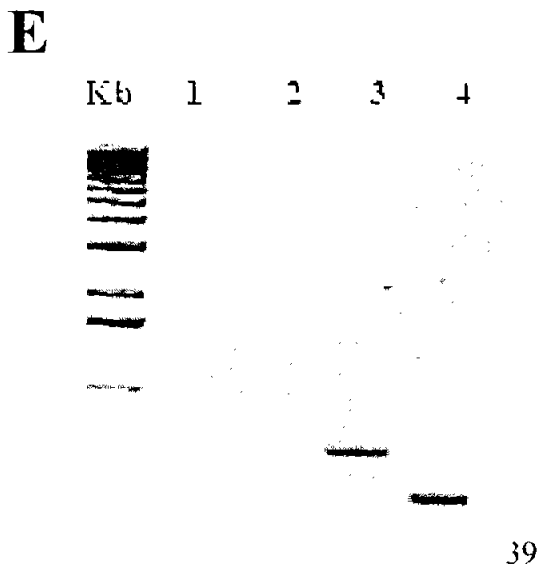
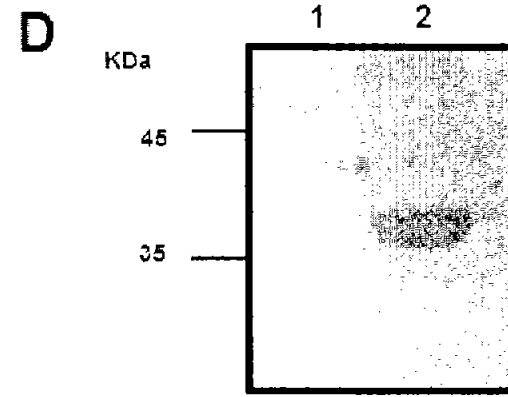
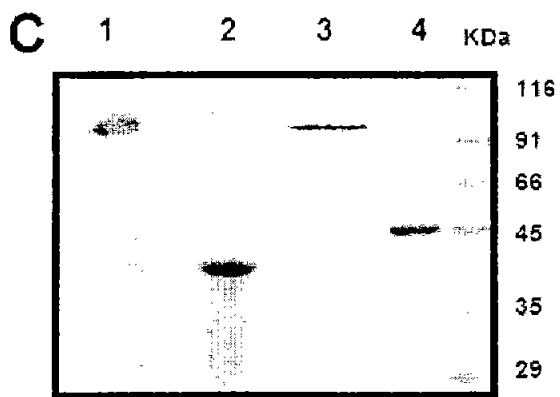
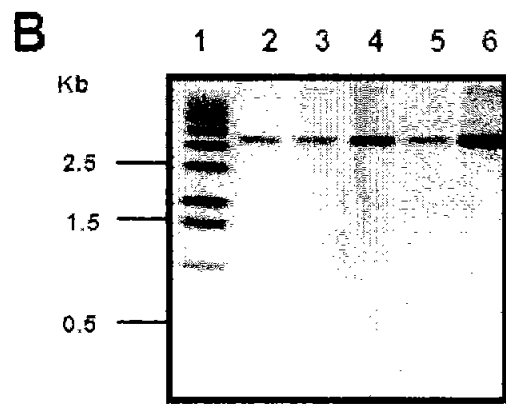
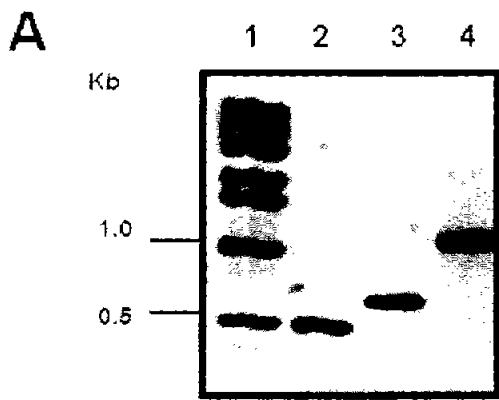


Figura 2. Generación de la proteína de fusión OmpC-gp39. A) La amplificación fue realizada como se describe en Material y Métodos. Carril 1, marcador de tamaño molecular 1 Kb; Carril 2, producto de 420 bp que contiene la región de CD154 en el lado 5' terminal. Carril 3, producto de 713 bp que contiene la región de CD154 en el lado 3' inicial. Carril 4, fusión. B) Inserción del fragmento *KpnI-KpnI* en el plásmido pST13. Carril 1; Marcador de 1Kb. Carriles 2, 4 y 5 digestión de clonas sin el inserto *KpnI*. Carriles 3 y 6, clonas con el inserto *KpnI-KpnI* de 700 bp. C) Patrón electroforético de las porinas OmpC y OmpC-gp39. Las cepas de *E. coli* fueron transformadas con los plásmidos pST13 y pST13-gp39, y las PME fueron purificadas y analizadas por electroforesis como se describe en Material y Métodos. Carril 1; *E. coli* UH302 con el plásmido pST13 sin hervir. Carril 2; misma cepa hervida. Carril 3; *E. coli* UH302 con el plásmido pST13-gp39 sin hervir y Carril 4; misma cepa hervida. D) Inmunoblot de las porinas purificadas como se describe en Material y Métodos. Las porinas fueron reveladas con un "cocktail" de anticuerpos monoclonales contra OmpC. Línea 1; Porinas de *E. coli* UH302-pST13-gp39. Carril 2; Porinas de *E. coli* UH302-pST13. E). Análisis mediante PCR de la inserción de la región CD154 en el asa cinco de la porina OmpC. Mediante el empleo de los "primers" internos gp39III y gp39IV. Carril 1 y 2 plásmido pST13 sin la región de CD154 con los "primers" Ompc1/gp39III y Ompc2/gp39IV, respectivamente. Carril 3 y 4; plásmido pST13 con la región de CD154 con los "primers" Ompc1/gp39III y Ompc/gp39IV, respectivamente. F) Sitio de inserción de la secuencia de CD40L en la de la porina OmpC-gp39.

(Figura 2D). La mayor masa molecular de la proteína de fusión OmpC-gp39 podría ser debido a la sustitución de 10 de los residuos de la asa cinco de la porina OmpC por los 10 residuos de la región W140-S149 del CD154 humano. La inserción del fragmento W140-S149 fue confirmada por PCR empleando "primers" con la secuencia de CD154 y por secuenciación (Figura 2E). En la Figura 2F se muestra el sitio de la inserción de la región de gp39 en el asa cinco de la porina OmpC usando el modelo de la porina OmpF de *E. coli* (59).

VIII.3. La proteína de fusión OmpC-gp39 se une a CD40 soluble.

La capacidad de unión de la proteína de fusión OmpC-gp39 con CD40 fue probada en diferentes variantes de ELISA. En primer lugar se demostró la capacidad de la proteína OmpC-gp39 para inhibir la interacción CD154/CD40. Para lo cual placas de 96 pozos fueron recubiertas con una proteína de fusión CD40-Fc e incubadas con la proteína

recombinante soluble CD154, y revelada con un anticuerpo anti-CD154 y un anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP. La inhibición se realizó mediante la preincubación de la proteína CD154 con concentraciones crecientes de las proteínas OmpC, OmpC-gp39 o un anticuerpo monoclonal anti-CD40. Las concentraciones van de 0.4-50µg/ml (Figura 3A). La proteína de fusión OmpC-gp39 fue capaz de inhibir la unión de CD154 a la proteína CD40-Fc de manera muy similar al anticuerpo anti-CD40, en contraste con la proteína OmpC la cual no inhibe la unión CD154/CD40. La inhibición inducida por la proteína OmpC-gp39 fue dependiente de la concentración ($P < 0.05$), dato que apoya su especificidad.

Se realizó un ensayo de unión directa OmpC-gp39 con CD40. Placas de microtitulación recubiertas de con OmpC u OmpC-gp39 se incubaron con una proteína recombinante CD40-Fc, y revelaron con anticuerpo anti-Fc humano conjugado a HRP (como control se usaron placas sin incubar con la proteína de fusión CD40-Fc). La Figura 3B muestra que la proteína OmpC-gp39 es capaz de unir a la proteína CD40-Fc de manera concentración dependiente ($P < 0.05$), mientras que la proteína OmpC nativa no fue capaz de unirse a la proteína CD40-Fc, sugiriendo que el fragmento de CD154 (W140-S149) es la región o una de las regiones que se unen a CD40. No se observó señal cuando la proteína CD40-Fc no estuvo presente en el ensayo de unión (Figura 3B) o cuando se adicionó un exceso de la proteína rhsCD154. Estos resultados indican que la proteína de fusión OmpC-gp39 que contiene el dominio W140-S149 de CD154 reconoce al CD40.

Se realizaron dos ensayos de competencia entre CD154 y OmpC-gp39 para unir CD40. En el primero placas de microtitulación se recubrieron con CD40-Fc, se incubaron con las proteínas OmpC-gp39 u OmpC, y se revelaron con un "cocktail" de anticuerpos monoclonales contra OmpC, y un anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP. El ensayo de competencia se realizó con la adición de la mezcla de porinas y la proteína CD154. La Figura 3C muestra que la proteína OmpC-gp39 fue capaz de unir a la proteína CD40-Fc de manera concentración dependiente; sin embargo, la proteína OmpC no fue capaz de unirse.

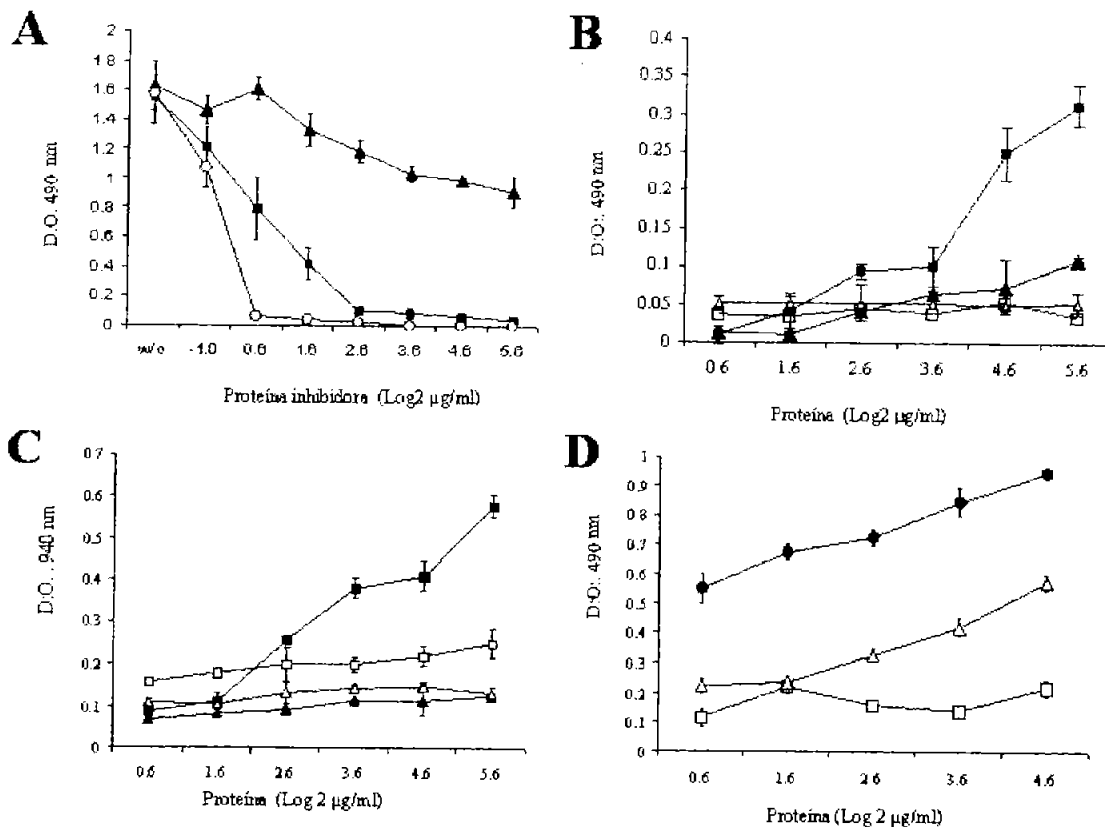


Figura 3. Evaluación de la unión de la porina OmpC-gp39 con CD40 por ELISA. A) La porina OmpC-gp39 inhibe la unión de CD40 con CD154. Placas de 96 pozos fueron recubiertas con una proteína de fusión CD40-Fc (2 µg/ml) e incubadas con la proteína rhCD154 (5 µg/ml), y con un anticuerpo anti CD154, finalmente revelado con un anticuerpo anti-ratón IgG-HRP. El ensayo de inhibición se realizó preincubando la proteína CD40-Fc con la porina OmpC (Triángulos rellenos), OmpC-gp39 (Cuadros rellenos) o con un anticuerpo monoclonal contra CD40 (Círculos). B) La porina OmpC-gp39 une CD40. Placas de 96 pozos fueron recubiertas con concentraciones crecientes de OmpC-gp39 (Cuadros rellenos) u OmpC (Triángulos rellenos) (0.4-50 µg/ml) e incubadas con la proteína CD40-Fc (4 µg/ml) y luego con un anticuerpo anti-humano IgG-HRP. Los controles incluyen placas con OmpC (Triángulos blancos) y OmpC-gp39 (Cuadros blancos), pero sin la adición de CD40-Fc. C) La porina OmpC-gp39 compete con CD154 por la unión con CD40. Placas de 96 pozos fueron recubiertas con CD40-Fc, e incubadas con OmpC-gp39 u OmpC (10 µg/ml), luego con un "cocktail" de anticuerpos monoclonales contra OmpC, y luego con un anticuerpo anti-ratón IgG-HRP. La competencia se realizó por la mezcla con CD154 (5 µg/ml), OmpC-gp39 (Cuadros rellenos), OmpC-gp39 más CD154 (Cuadros blancos), OmpC (Triángulos rellenos), OmpC con CD154 (Triángulos blancos). D) OmpC-gp39 compete con CD154 por la unión con CD40. Placas de 96 pozos fueron recubiertas con la proteína CD40-Fc, e incubadas con concentraciones crecientes de CD154, luego con un anticuerpo monoclonal anti-CD154, y con un anticuerpo anti-ratón IgG-HRP. La competencia se realizó mediante la mezcla con OmpC u OmpC-gp39 (10 µg/ml). CD154 (Círculos rellenos), CD154 más OmpC-gp39 (Cuadros blancos), CD154 más OmpC (Triángulos blancos). Se presentan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La presencia de la proteína CD154 recombinante induce una clara inhibición en la unión de OmpC-gp39 a CD40-Fc ($P < 0.05$). Para corroborar estos datos, se realizó un ensayo de competencia inversa de la manera siguiente. Placas recubiertas con CD40-Fc fueron incubadas con diferentes concentraciones de la proteína CD154. Luego las placas fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD154 y reveladas con un anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP. La competencia fue realizada mediante la adición de una mezcla de porinas y la proteína CD154. La Figura 3D muestra que la proteína CD154 se une a la proteína CD40-Fc de manera concentración dependiente y la proteína de fusión OmpC-gp39 fue capaz de inhibir esta interacción. Es interesante que en este experimento la mezcla de CD154 con OmpC nativa disminuye en un $\approx 40\%$ la unión de CD154 con CD40-Fc sugiriendo una unión inespecífica o inhibición estérica ($P < 0.05$).

VIII.4. La proteína de fusión OmpC-gp39 se une al linfoma de células B humano Raji.

La capacidad de la proteína OmpC-gp39 de unirse a células Raji fue analizada por citometría de flujo. Células Raji fueron incubadas con concentraciones crecientes de las proteínas OmpC u OmpC-gp39, las cuales fueron marcadas con FITC. La Figura 4A muestra claramente que la proteína OmpC-gp39 fue capaz de unirse a células Raji de manera concentración dependiente. Esta unión es específica con CD40, ya que la presencia de un anticuerpo anti-CD40 (Figura 4A) o la proteína OmpC-gp39 sin marca con FITC la inhiben. Este resultado no se observa cuando se emplea la proteína OmpC nativa (Figura 4A). A las mismas concentraciones de la proteína OmpC se observa una discreta unión a las células Raji, pero esta unión es independiente de CD40 ($P < 0.05$).

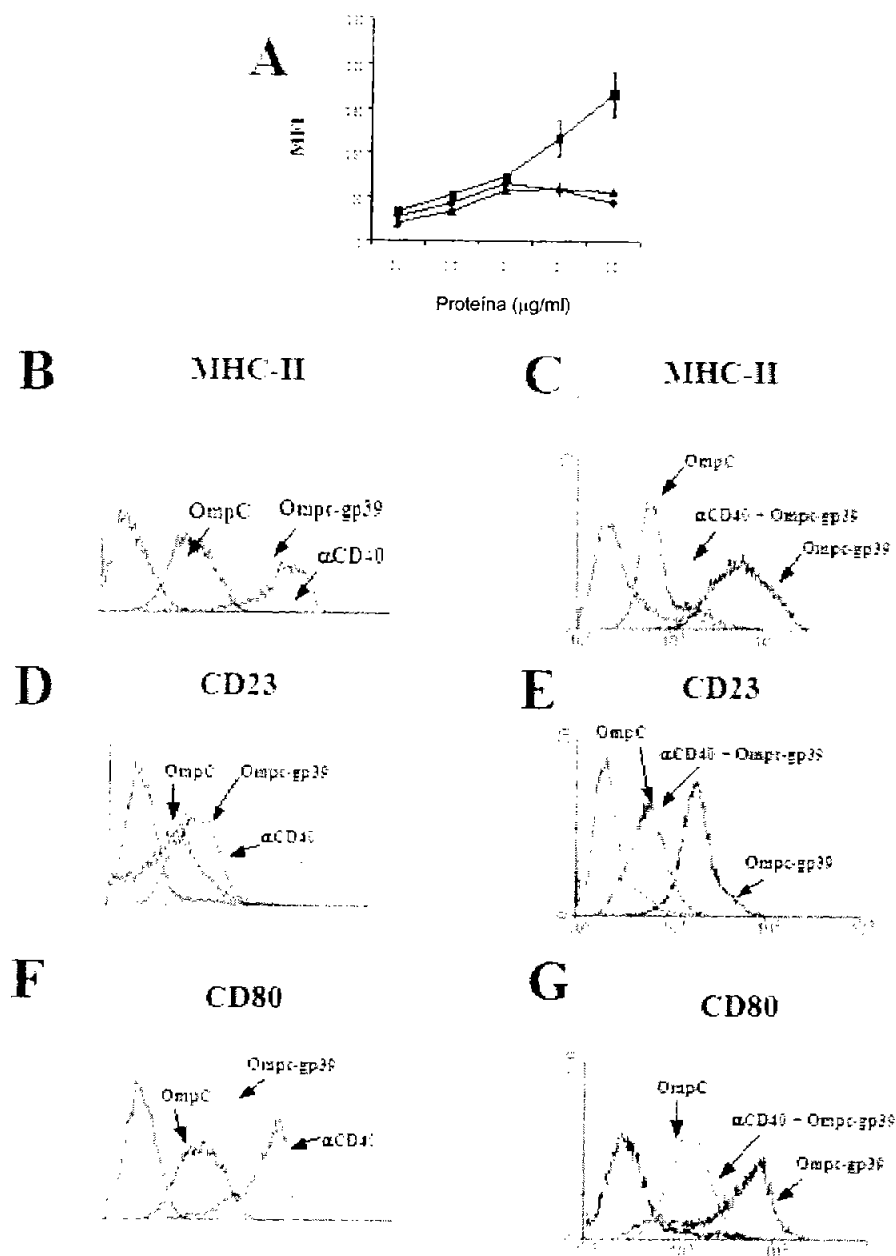


Figura 4. A) La proteína OmpC-gp39 es capaz de unirse a células B humanas. Células Raji fueron cultivadas e incubadas con las proteínas OmpC-gp39 u OmpC conjugadas a FITC como se describe en Material y Métodos. Las células fueron analizadas por Citometría de Flujo. La inhibición se realizó mediante la adición de proteínas sin marcar o el empleo de un anticuerpo anti-CD40 (1 µg/ml), OmpC-gp39 (Cuadros rellenos), OmpC (Triángulos rellenos), OmpC-gp39 más anticuerpo anti-CD40 (Rombos rellenos), La media

y desviación estándar de tres experimentos independientes fueron graficadas. B, D y F) La proteína OmpC-gp39 activa células B humanas. La capacidad de activación de células B humanas de la proteína OmpC-gp39 fue evaluada por la determinación en el incremento en la expresión de las moléculas MHC-II, CD23 y CD80, determinadas por citometría de flujo. Células Raji fueron incubadas con las proteínas OmpC y OmpC-gp39 (50 µg/ml) o con un anticuerpo anti-CD40 (1 µg/ml), capaz de inducir activación via CD40 en presencia de IL-4 (200 U/ml). Anticuerpos anti-MHC-II, CD23 y CD80 conjugados a FITC fueron utilizados y las células analizadas por Citometría de Flujo, se presenta uno de cinco experimentos. C, E y G) La actividad de la proteína OmpC-gp39 sobre las células Raji es inhibida por la presencia de un anticuerpo anti-CD40. Las células Raji fueron cultivadas como se describe en B, D y F, pero la proteína OmpC-gp39 fue mezclada con un anticuerpo monoclonal anti-CD40 y analizadas como se describe, se presenta uno de cinco experimentos independientes.

VIII.5. La proteína de fusión OmpC-gp39 activa al linfoma de B humano Raji.

La proteína de fusión OmpC-gp39 purificada tiene actividad biológica, ya que fue capaz de activar células Raji. Esta activación fue evaluada mediante el análisis en la expresión de las proteínas MHC-II, CD23 y CD80. Las células Raji fueron incubadas con 50 µg/ml de la proteína, OmpC u OmpC-gp39 por 18 h y posteriormente con anticuerpos específicos conjugados a FITC, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo (Figura 4 B, D, F). La proteína OmpC-gp39 induce un incremento en la expresión de MHC-II de manera comparable a la que induce un anticuerpo anti-CD40 (Figura 4B), también induce expresión de CD23 y CD80. Es interesante que la proteína OmpC induce la expresión de las tres moléculas de superficie investigadas, aunque la intensidad de expresión fue menor que la producida por la proteína OmpC-gp39 o el control anticuerpo anti-CD40 ($P < 0.05$). Esta observación inesperada puede ser atribuida a una actividad biológica intrínseca de la porina OmpC, ya que las células Raji no fueron activadas por las cantidades equivalentes de LPS encontradas en las porinas purificadas (10 ng/ml para OmpC y 8 ng/ml para OmpC-gp39). La concentración de LPS fue determinada por el método de coagulación de amebocitos de *Limulus polyphemus*. La incubación de la proteína OmpC-gp39 con un anticuerpo anti-CD40 competidor y que bloquea esta actividad muestra una clara inhibición en la expresión de MHC-II, CD23 y CD80 inducida por la proteína OmpC-gp39, sugiriendo

que la actividad biológica de OmpC-gp39 requiere de la interacción con CD40 y es independiente de LPS (Figuras 4 C, E y G).

VIII.6. La proteína de fusión OmpC-gp39 activa células B humanas de sangre periférica.

La proteína de fusión OmpC-gp39 también fue capaz de activar células B humanas de sangre periférica, ya que la incubación de estas células con diferentes concentraciones de la proteína induce un incremento en la expresión de las moléculas MHC-II, CD23 y CD80 (Tabla 1). Desafortunadamente, a diferencia de la línea celular Raji el incremento de la expresión de moléculas como MHC-II, CD23 y CD80 en linfocitos B humanos purificados de sangre periférica no son significativamente diferentes comparados con los niveles inducidos por la porina OmpC. El incremento en la expresión de estas moléculas es dependiente de la concentración de ambas proteínas, lo que reduce la posibilidad de que la activación inducida por la proteína OmpC sea inespecífica. Se realizaron análisis por ELISA para determinar la inducción de secreción de inmunoglobulinas en linfocitos B de sangre periférica tratadas con las proteínas OmpC-gp39 y OmpC (Figura 5). Se observó un ligero incremento en la producción de IgG total comparado con la inducción generado por el tratamiento con la OmpC, aunque este no fue significativo, posiblemente por el estadio de maduración que presentan la mayoría de linfocitos B de sangre periférica. Cabe mencionar que también el control de un anticuerpo anti-CD40 no indujo de manera significativa un incremento en la producción de IgG total (Dato no mostrado). Por ello, se requiere de un estudio con células inmaduras para evaluar la capacidad de la proteína OmpC-gp39 para activar linfocitos B.

Tabla 1. La proteína OmpC-gp39 induce la expresión de MHC-II, CD23 y CD80 en linfocitos B de sangre periférica.

Estimulo	MHC-II	CD23	CD80
	IMF = DS	IMF = DS	IMF = DS
Medio	78 = 32	56 = 27	67 = 33
α -CD40	496 = 32	366 = 36	316 = 47
OmpC	418 = 45	212 = 36	188 = 27
OmpC-gp39	476 = 56	236 = 67	210 = 55

Los datos presentados representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) y la desviación estándar (DS) es de tres experimentos independientes

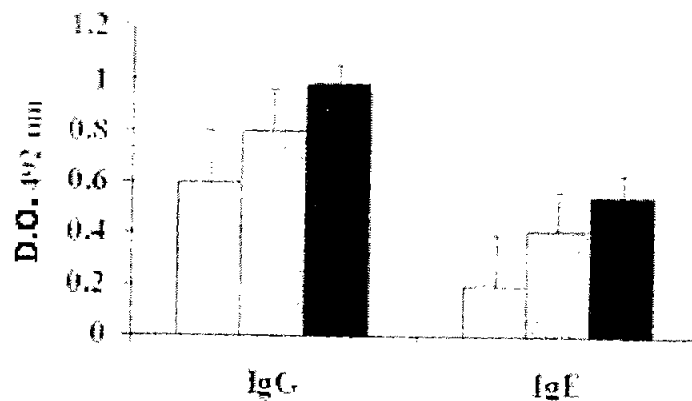


Figura 5. La proteína OmpC-gp39 es capaz de inducir un incremento en la expresión de IgG e IgE. Linfocitos de sangre periférica fueron incubados con las proteínas OmpC-gp39 u OmpC (50 µg/ml) como se describe en Material y Métodos. La barra blanca indica la concentración de inmunoglobulinas en el control tratado con IL-4 (100U/ml), la barra gris representa las concentraciones en presencia de la porina OmpC nativa y las barras negras son los valores obtenidos en la presencia de la porina OmpC-gp39. Se presentan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

VIII.7. La proteína de fusión OmpC-gp39 induce proliferación de células B humanas de sangre periférica.

Se evaluó la capacidad de la proteína OmpC-gp39 para inducir proliferación de células B de sangre periférica, utilizando como control un anticuerpo anti-CD40 capaz de activar a las células B (**Figura 6**). Es interesante que la proteína OmpC-gp39 fue capaz de inducir activación, proliferación y diferenciación de células B de sangre periférica, pero esta actividad biológica también se presentó con la proteína OmpC y el análisis estadístico de tres diferentes experimentos no muestra diferencias significativas entre ambas proteínas. La causa de la actividad biológica intrínseca de la porina OmpC en células B de sangre periférica se discute más adelante.

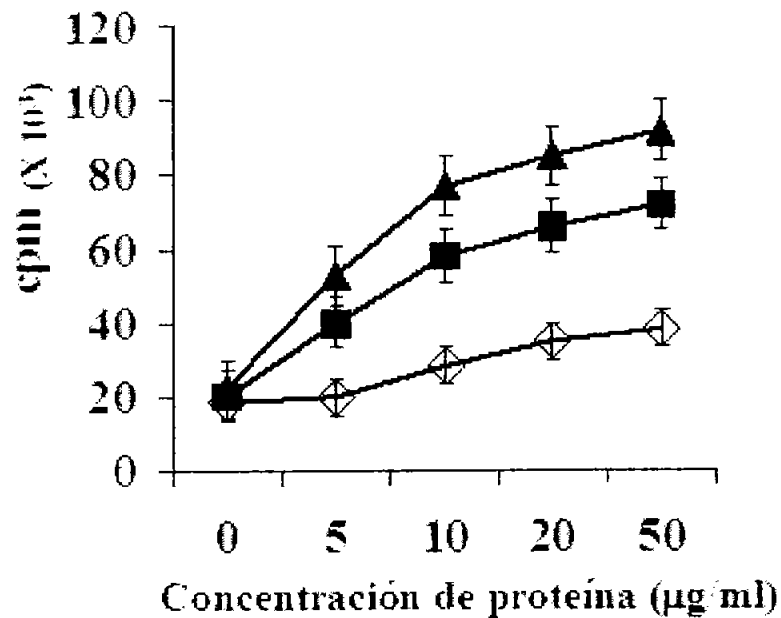


Figura 6. La proteína OmpC-gp39 fue capaz de inducir proliferación de linfocitos B de sangre periférica. Linfocitos B de sangre periférica fueron incubados con las proteínas OmpC-gp39 u OmpC como se describe en Material y Métodos. Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las proteínas (5, 10 ,20 y 50 µg/ml). OmpC (Cuadros rellenos), OmpC-gp39 (Triángulos rellenos), IL-4 (100U) (Rombos vacíos), después de 48 h las células fueron pulsadas con ³H-timidina por 6 h. Las células se cosecharon en fibras de nylon y se determinó la incorporación de ³H-timidina. Se presentan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

CD154 es una glicoproteína miembro de la familia del TNF que se expresa en linfocitos T activados. La interacción y señalización a través de CD40 es esencial para una gran variedad de funciones del sistema inmune, incluyendo maduración y activación de células B y T, producción de anticuerpos y cambio de isotipo de inmunoglobulinas. Actualmente no se cuenta con un modelo de la interacción CD154/CD40, pero el análisis cristalográfico de un fragmento CD154 muestra una estructura trimérica, similar a la de otros miembros de la misma familia. Utilizando como modelo la estructura cristalográfica de TNF/TNFR se han logrado predecir las regiones de CD154 y CD40 que interaccionan.

Se cree que las dos regiones formadas por dos monómeros de CD154 adyacentes participan en la unión con CD40. Los aminoácidos críticos en CD154 incluyen K143, Y145, Y146, R203 y Q220. Sin embargo, en CD40 se incluyen los aminoácidos E74, Y82, D84, N86 y E117. Tres proteínas recombinantes de CD154 reportadas (85) apoyan la idea de que los aminoácidos en la región comprendida entre W140-S149 pueden ser muy importantes para la unión y señalización a través de CD40. Estas proteínas recombinantes comprenden los residuos Y45-L261, E108-L261 y son biológicamente activas, sin embargo una tercera que incluye los residuos S149-L261, es capaz de unirse a CD40 pero no es funcional (169). Estos hallazgos indican que la región extracelular de CD154 contiene regiones que se unen a CD40, pero que no necesariamente estimulan su actividad biológica.

Los anticuerpos generados contra diferentes regiones de CD40 presentan diferentes actividades biológicas, que van desde la unión con CD40 que inhibe la interacción con CD154, hasta la capacidad de unirse a CD40 e inducir activación de linfocitos B, demostrando que la interacción de pequeños péptidos con regiones definidas de CD40 puede desencadenar respuestas biológicas diferentes (178).

La alineación de CD154 con el TNF y la linfotoxina, así como la información obtenida a partir de la secuenciación y que ha sido confirmada mediante mutagénesis dirigida, han permitido identificar que los residuos de amino ácidos en las posiciones 140-149 de CD154 (WAEKGYTMS) interaccionan con CD40 (75;83;84;176).

Con la hipótesis de que esta región es importante para la unión con CD40 y de que puede inducir activación de linfocitos B, se insertó mediante ingeniería genética en el asa cinco de la porina OmpC de *Salmonella enterica* serovar Typhi y se evaluó la capacidad de la proteína de fusión resultante (OmpC-gp39) de interaccionar con CD40 y desencadenar una actividad biológica.

OmpC, al igual que otras porinas, tiene una estructura terciaria semejante a un barril o dona insertada en la membrana externa de la bacteria, que contiene asas orientadas hacia el medio externo. Estas asas contienen sitios permisivos donde pueden ser integrados péptidos foráneos sin alterar su estructura. Aunque no se ha realizado un análisis detallado de la localización de estos sitios permisivos y de la extensión de los péptidos que pueden ser insertados en la asas externas, las experiencias con otras porinas permiten suponer que las asas 5, 6 y 7 pueden contener péptidos foráneos de aproximadamente 10 a 15 amino ácidos. Además nosotros hemos reportado que un péptido alergénico fusionado con el asa cinco de la porina OmpC es capaz de modular la respuesta inmune en un modelo murino de alergia a ovalbúmina (157). Otro aspecto considerado en la elección de la porina OmpC como acarreador de la región 140-149 de CD154 fue su propiedad de formar homotrímeros. Se considera que la conformación trimérica o al menos dimérica, es una de las condiciones para que la interacción CD40/CD154 sea funcional (179). CD154 atrae y agrupa CD40, el cual se localiza en balsas lipídicas que contienen MHC-II y CD80 (34;37). Por supuesto que se esperaría que la interacción tridimensional entre OmpC-gp39 con CD40 no fuese similar a la de CD40L, pero si es razonable pensar que pudiese iniciar el proceso de agrupación de CD40.

La proteína OmpC-gp39 conservó la propiedad de formar trímeros en solución. El análisis electroforético en condiciones semi-reductoras de esta proteína purificada a partir de *E. coli* UH302, la cual carece de la expresión endógena de la porina OmpC, muestra un corrimiento similar a la porina OmpC nativa (Figura 2C). Sin embargo, la expresión de la proteína OmpC-gp39 en esta cepa de *E. coli* fue menor si la comparamos con la expresión de la proteína OmpC. Este resultado es consistente con otras proteínas de fusión obtenida en nuestro laboratorio y puede ser explicado por el uso de codones de baja eficiencia en las secuencias insertadas en la porina. También hemos considerado la posibilidad de que estos amino ácidos insertados confieran una menor eficiencia de plegamiento, teniendo como consecuencia una disminución en la expresión de esta proteína, como resultado de un proceso de degradación de esta proteína en citosol (144), pues mutaciones en las porinas o cambios en sus secuencias pueden contribuir a disminuir su eficiencia de ensamble y no ser expresadas y por lo tanto degradadas en el espacio periplásmico por las proteinasas como la proteína DegP (180). Fenómeno que pudiese suceder con nuestra proteína de fusión y disminuir su eficiencia de expresión. Sin embargo, la proteína OmpC-gp39 fue purificada y sus propiedades biológicas fueron analizadas.

Mediante ensayos de competencia por ELISA se analizó la capacidad de unión de la porina OmpC-gp39 con CD40. Se demostró que la porina OmpC-gp39 fue capaz de inhibir la unión de una proteína de fusión CD40-Fc con CD154 soluble de manera muy similar a un anticuerpo antagonista anti-CD40. La inhibición se llevo a cabo preincubando la proteína CD154 con concentraciones crecientes de OmpC, OmpC-gp39 o el anticuerpo monoclonal anti-CD40. Solo la proteína OmpC-gp39 y el anticuerpo anti-CD40 fueron capaces de inhibir la unión CD154/CD40-Fc de manera dependiente de la concentración (Figura 3A). En seguida se realizó un ensayo de unión CD40/OmpC-gp39, recubriendo placas de microtitulación con las proteínas OmpC u OmpC-gp39, e incubando con la proteína CD40-Fc. En este ensayo se observó una unión dependiente de la concentración de CD40-Fc para OmpC-gp39 (Figura 3B), pero no para la proteína OmpC nativa. Otros dos ensayos

realizados con placas recubiertas con CD40-Fc, las cuales fueron incubadas con una mezcla de CD154 y OmpC-gp39, y posteriormente con anticuerpos contra CD154 u OmpC, confirmaron que la proteína OmpC-gp39 compite con CD154 por su unión con la proteína CD40-Fc (Figura 3C y D). Estos datos nos sugieren fuertemente que la proteína OmpC-gp39 tiene la capacidad de unirse a moléculas de CD40 solubles y que su capacidad de unión con CD40 es muy considerable pues logra competir con él ligando natural CD154 soluble. Esta unión presenta una menor afinidad que la proteína recombinante CD154, ya que se requiere de mayores concentraciones para alcanzar una unión parecida a la del CD154, aunque no se realizaron ensayos para calcular la afinidad, se puede inferir que la unión es considerable, ya que las concentraciones utilizadas son similares a las empleadas en otros sistemas de unión de receptor-ligando como la unión de CD200-CD200R (181).

Para demostrar que la proteína OmpC-gp39 era capaz de unirse a CD40 expresado en linfocitos B, las proteínas OmpC-gp39 y OmpC fueron conjugadas a FITC y mediante citometría de flujo, analizamos su capacidad de unión. La proteína OmpC-gp39 se unió a células Raji de manera dependiente de la concentración (Figura 4 A), y la especificidad de la unión fue demostrada mediante el empleo de un anticuerpo anti-CD40 y la proteína OmpC-gp39 sin conjugar, dado que la preincubación de células Raji con el anticuerpo o la proteína OmpC-gp39 sin conjugar inhiben la unión de la proteína OmpC-gp39-FITC. De igual manera al analizar la capacidad de unión de la proteína OmpC nativa, encontramos que esta proteína no es capaz de unirse a las células Raji de manera similar a la presentada por la proteína OmpC-gp39 (Figura 4A). Estas observaciones sustentan la idea de que la proteína OmpC-gp39 es capaz de unirse a CD40 nativo expresado en la superficie de linfomas de B.

La proteína OmpC-gp39 también fue capaz de activar líneas de linfocitos B, y linfocitos B de sangre periférica. Esta propiedad se evaluó por la inducción del incremento en la expresión de las proteínas MHC-II, CD23 y CD80, función que se sabe sucede por la

interacción CD40/CD154(40;51;173;182). En células Raji, la proteína OmpC-gp39 induce un incremento en la expresión de MHC-II y CD23 de manera comparable con la inducida por un anticuerpo anti-CD40 (Figura 4B y tabla 1), mientras que el incremento de CD80 es menor a la inducida por el anticuerpo anti-CD40 (Figura 4D, F y tabla 1).

En células Raji y linfocitos B de sangre periférica el comportamiento de la porina OmpC nativa fue inesperado, ya que esta proteína induce un incremento en la expresión de las tres proteínas analizadas (MHC-II, CD23 y CD80), aunque menor que la inducida por la proteína OmpC-gp39. Este resultado fue consistente en los diferentes experimentos independientes realizados. La posible actividad de LPS en nuestro sistema fue descartada utilizando las cantidades de LPS equivalentes al contenido en las proteínas OmpC-gp39 y OmpC, las cuales no fueron capaces de activar células Raji. Sin embargo, la actividad biológica de OmpC-gp39 disminuyó al incubar la proteína OmpC-gp39 con un anticuerpo anti-CD40 que bloquea esta unión y que es incapaz de activar células B (Figura 4 C, E y G). De igual manera que en la línea celular la porina OmpC-gp39 induce la expresión de MHC-II, CD23 y CD80 en linfocitos B purificados de sangre periférica, pero a diferencia que en células Raji, esta inducción no es significativamente diferente a la inducida por la proteína OmpC (Tabla 1).

Estos resultados sugieren que OmpC tiene una actividad biológica intrínseca y son consistentes con otras observaciones en diferentes proteínas de membrana externa de origen bacteriano (183). La porina OmpA de *Klebsiella pneumoniae* es capaz de unirse al "Toll- Like Receptor" (TLR) 2 e inducir la expresión de IL-2 y la maduración de células dendríticas (184). También la porina de *Shigella dysenteriae* es capaz de inducir la expresión de TLR2 e induce la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos *in vivo*, así como la secreción de IL-12 influenciando la respuesta Th1. Por otro lado, la porina de *Haemophilus influenzae*, es capaz de inducir la producción de citocinas como TNF- α e IL-6 de manera dependiente de TLR-2 y MyD88 (185). Esta actividad es totalmente

independiente de LPS, pues ratones C3H/HeJ (que son carentes de la función de TLR-4 el cual esta involucrado en la respuesta al LPS) responden de manera similar ante el estímulo con estas porinas. La propiedad inmunogénica de las porinas de *Neisseria sp* se debe a su capacidad de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 en linfocitos B, la cual es dependiente de TLR-2, de la actividad de MyD88 y de la activación de NF- κ B (186). Por otro lado las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium son capaces de activar la proteína de activación 1 (AP-1) y NF- κ B, a través de la cascada de las MAPKs (187). Además induce la producción de NO, a través de la activación de la vía de “Proteín-Cinasas C” (PKC) (188). Otro estudio demuestra que la proteína PorB de *Neisseria gonorrhoeae* induce apoptosis en macrófagos humanos (189). Por ello, es nuestra opinión que debe considerarse que las porinas contienen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos)

Es interesante señalar que la proteína OmpC-gp39 cultivada en presencia de IL-4 es capaz de activar células B purificadas de sangre periférica. Estos resultados fueron controversiales puesto que la activación presentada por esta proteína de fusión no es estadísticamente diferente a la activación inducida por la porina OmpC nativa (Tabla 1). Estos resultados pueden ser explicados por la actividad biológica intrínseca de la propia porina, como ya se mencionó anteriormente, sin embargo se ha considerado modificar las condiciones experimentales para tratar de elucidar si esta proteína de fusión presenta una mayor activación de células B humanas comparado con la porina nativa. Creemos que la interacción de la porina con el TLR2 expresado en los linfocitos B, puede estar implicado en esta activación intrínseca de la porina nativa y esto abre nuevas líneas de investigación. Es importante señalar que la proteína OmpC-gp39 fue capaz de inducir un ligero incremento en la expresión de las proteínas MHC-II, CD23 y CD80, comparado con la observada en la porina nativa. También fue posible observar un incremento no significativo en la producción de inmunoglobulinas, inducida por la incubación con la proteína OmpC-gp39 en sobrenadantes de células B de sangre periférica (Figura 5), para lo cual se evaluó

IgG e IgE, esta última en presencia de IL-4. Estas observaciones, aunque son muy preliminares, nos sugieren una participación de la región de CD154 presente en la porina OmpC. De la misma manera cuando analizamos la propiedad de inducir proliferación de linfocitos B de sangre periférica (Figura 6), encontramos que no hay diferencias estadísticas entre la inducción generada por la proteína OmpC-gp39 y la OmpC nativa, posiblemente las diferencias observadas sean debido a un efecto aditivo. Por estas razones, consideramos que son necesarios estudios más detallados para tener una mejor idea de la actividad biológica de la proteína OmpC-gp39 en células B de sangre periférica.

Los experimentos realizados en las células Raji, sugieren fuertemente que la proteína de fusión OmpC-gp39 es capaz de unirse de manera específica a CD40 y desencadenar una actividad biológica como lo hace CD154. Sin embargo, se requieren otros ensayos con linfocitos B purificados de sangre periférica para poner de manifiesto la capacidad de la proteína OmpC-gp39 de desencadenar una actividad biológica específica dependiente de la interacción con CD40, como se demostró con células Raji.

Los resultados que aquí se presentan contribuyen a entender la interacción CD40/CD154, lo cual es un punto esencial para comprender mejor la cooperación de linfocitos T y B y las bases de la respuesta inmune, en donde participan las moléculas CD40/CD154 y otras proteínas que pertenecen a la misma familia. De acuerdo a estos hallazgos es posible proponer las siguientes aplicaciones:

1. Se han generado varios anticuerpos anti-CD40 que reconocen diferentes epítopos de la proteína (66) y se ha establecido que hay una fuerte correlación entre el sitio de unión del anticuerpo y la señal inducida. Así por ejemplo, hay anticuerpos capaces de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras como CD23 y CD80, a diferencia de otros que no lo hacen. La inducción en la expresión de MHC-II no presenta una clara correlación con el sitio de unión del CD154, pues anticuerpos que reconocen sitios fuera de esta región son capaces de inducir la expresión de moléculas MHC-II. En este estudio se demostró la

proteína OmpC-gp39 induce expresión de moléculas coestimuladoras, de complejos MHC-II y activación. Lo que ofrece una ventaja sobre el empleo de anticuerpos monoclonales, porque su actividad es limitada y depende del sitio de reconocimiento. El hecho de que la proteína OmpC-gp39 induzca esta gama de respuestas, a pesar de solo reconocer una pequeña región de CD40, sugiere que la respuesta generada por la unión de CD40 no depende del sitio de unión y de la conformación con la que se del estímulo a CD40, de manera similar como en otros miembros de la familia del TNFR que es mediada por su entrecruzamiento (190). Es posible pensar que otra proteína de fusión que conteniendo una región diferente de CD154 tuviese funciones bloqueadoras de CD40 y que pudiese servir como inhibidor competitivo de CD154. Sin embargo, la actividad intrínseca de OmpC que descubrimos inesperadamente en este trabajo, hace poco probable esta hipótesis. Por lo que es importante realizar estudios empleando otras proteínas acarreadoras como MisL (191).

2. Actualmente se está tratando de aclarar el papel de CD40 y CD154 en la proliferación y diferenciación de células tumorales (192) y se ha sugerido que un inmunorreactivo que regule la interacción CD40/CD154, puede tener una gran utilidad en el tratamiento de linfomas y en padecimientos caracterizados por procesos de inflamación crónica como la EAE y la esclerosis múltiple (193). Actualmente se emplean anticuerpos anti-CD40 o CD154 recombinantes en estudios de fase I para el tratamiento en linfomas No-Hodgkin (194). En estos estudios se ha demostrado que la capacidad terapéutica de este reactivo está determinada por su propiedad de inducir activación de las células malignas incrementando la expresión de moléculas de superficie como MHC-II, CD80 y CD86. Lo que permite un mayor reconocimiento de estas por parte de los linfocitos T efectores induciendo mecanismos citotóxicos de eliminación. Consecuentemente, es razonable pensar que la proteína generada en este estudio puede ser utilizada en el tratamiento de padecimientos como linfomas. Esta conjetura abre nuevas posibilidades de investigación en modelos humanos *in vitro* y murinos *in vivo*. Sin embargo, la secuencia que se insertó en la porina

OmpC corresponde a la secuencia humana y se debiera construir la proteína de fusión homóloga del ratón.

3. Por último, mediante la administración de antígenos en conjunto con anticuerpos anti-CD40 o proteínas recombinantes de CD154 es posible generar una mayor respuesta inmune, que se debe a la actividad adyuvante de CD154 (195). Para evitar inmunizaciones repetidas y altas dosis de antígeno que pueden producir efectos colaterales (196;197). En este estudio se demostró que la proteína de fusión OmpC-gp39 presenta un efecto adyuvante, pues es capaz de generar la activación de células B. Además es posible modificar dos diferentes asas de la porina OmpC y de este modo potenciar la respuesta inmunológica ante determinado antígeno. Así, proponemos que la proteína de fusión OmpC-gp39 puede servir como acarreadora de antígenos, ofreciendo un poder adyuvante sobre el empleo de otros sistemas acarreadores, e inclusive los acarreadores vivos atenuados como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium(97). Esto aporta las bases para el desarrollo de nuevas y mejores vacunas, pues la vacunación con DNA que codifica para un antígeno y que contiene el gene de CD154, incrementa la producción de anticuerpos específicos (96) favoreciendo la eficiencia de la respuesta inmune humoral.

En resumen, en este trabajo se demostró que la inserción de la región W140-S149 de CD154 en la porina OmpC es capaz de unirse de manera específica a CD40 soluble o expresado en células B humanas y constituyen el primer reporte de una proteína de fusión que contiene una pequeña región de CD154 y que es capaz de unirse a su receptor específico e inducir activación de células B. Este sistema puede ser útil para el estudio de la interacción ligando-receptor y para el desarrollo de proteínas con propiedades terapéuticas. Esta proteína puede ser una herramienta para conocer mejor la interacción CD40/CD154 y pudiese ser empleada en la modulación de la respuesta en modelos de linfomas de células B y tener aplicación como vector en la generación de vacunas que contengan el poder

adyuvante de la interacción CD40/CD154 para inducir una respuesta inmunológica ante un antígeno específico.

X. REFERENCIAS.

- (1) Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA et al. Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature* 1992; 358(6389):727-733.
- (2) Van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(3):330-337.
- (3) Clark EA. CD40: a cytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens* 1990; 36(1):33-36.
- (4) Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 1993; 178(2):669-674.
- (5) Caux C, Burdin N, Galibert L, Hermann P, Renard N, Servet-Delprat C et al. Functional CD40 on B lymphocytes and dendritic cells. *Res Immunol* 1994; 145(3):235-239.
- (6) Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(10):4342-4346.
- (7) Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1995; 182(1):33-40.
- (8) Galy AH, Spits H. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 1992; 149(3):775-782.
- (9) Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(1):4-43.
- (10) Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben Aissa H, Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1985; 20(1):23-28.

- (11) Ledbetter JA, Shu G, Gallagher M, Clark EA. Augmentation of normal and malignant B cell proliferation by monoclonal antibody to the B cell-specific antigen BP50 (CDW40). *J Immunol* 1987; 138(3):788-794.
- (12) Armitage RJ, Tough TW, Macduff BM, Fanslow WC, Spriggs MK, Ramsdell F et al. CD40 ligand is a T cell growth factor. *Eur J Immunol* 1993; 23(9):2326-2331.
- (13) Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; 357(6373):80-82.
- (14) Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J Immunol* 1993; 151(5):2497-2510.
- (15) Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; 22(10):2573-2578.
- (16) Cronin DC, Stack R, Fitch FW. IL-4-producing CD8+ T cell clones can provide B cell help. *J Immunol* 1995; 154(7):3118-3127.
- (17) Grabstein KH, Maliszewski CR, Shanebeck K, Sato TA, Spriggs MK, Fanslow WC et al. The regulation of T cell-dependent antibody formation in vitro by CD40 ligand and IL-2. *J Immunol* 1993; 150(8 Pt 1):3141-3147.
- (18) Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993; 365(6444):340-343.
- (19) Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, Mazzei G, Aubry JP, Jomotte T et al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol* 1995; 25(3):863-865.
- (20) Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun* 2004; 18(1):7-12.
- (21) Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391(6667):591-594.

- (22) Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998; 393(6684):474-478.
- (23) Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998; 393(6684):478-480.
- (24) Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993; 259(5097):990-993.
- (25) Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412):539-541.
- (26) Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993; 72(2):291-300.
- (27) DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint BG. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412):541-543.
- (28) Durandy A, Honjo T. Human genetic defects in class-switch recombination (hyper-IgM syndromes). *Curr Opin Immunol* 2001; 13(5):543-548.
- (29) Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ et al. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1994; 1(5):423-431.
- (30) Renshaw BR, Fanslow WC, III, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B et al. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180(5):1889-1900.
- (31) Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3(9):822-829.
- (32) Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 1993; 177(4):925-935.

- (33) Armitage RJ, Sato TA, Macduff BM, Clifford KN, Alpert AR, Smith CA et al. Identification of a source of biologically active CD40 ligand. *Eur J Immunol* 1992; 22(8):2071-2076.
- (34) Grassme H, Bock J, Kun J, Gulbins E. Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem* 2002; 277(33):30289-30299.
- (35) Hostager BS, Catlett IM, Bishop GA. Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J Biol Chem* 2000; 275(20):15392-15398.
- (36) Vidalain PO, Azocar O, Servet-Delprat C, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Manie S. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J* 2000; 19(13):3304-3313.
- (37) Clatza A, Bonifaz LC, Vignali DA, Moreno J. CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. *J Immunol* 2003; 171(12):6478-6487.
- (38) Wheeler K, Pound JD, Gordon J, Jefferis R. Engagement of CD40 lowers the threshold for activation of resting B cells via antigen receptor. *Eur J Immunol* 1993; 23(5):1165-1168.
- (39) Haxhinasto SA, Hostager BS, Bishop GA. Cutting edge: molecular mechanisms of synergy between CD40 and the B cell antigen receptor: role for TNF receptor-associated factor 2 in receptor interaction. *J Immunol* 2002; 169(3):1145-1149.
- (40) Noelle R, Snow EC. T helper cells. *Curr Opin Immunol* 1992; 4(3):333-337.
- (41) Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* 1992; 13(11):431-433.
- (42) Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; 67(1):2-17.
- (43) Soong L, Xu JC, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley BJ et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 1996; 4(3):263-273.
- (44) Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 1996; 4(3):283-289.

- (45) Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T et al. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 1996; 4(3):275-281.
- (46) Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:111-135.
- (47) Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S et al. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 1997; 185(12):2053-2060.
- (48) Hanissian SH, Geha RS. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells. *Immunity* 1997; 6(4):379-387.
- (49) Lin SC, Stavnezer J. Activation of NF-kappaB/Rel by CD40 engagement induces the mouse germ line immunoglobulin Cgamma1 promoter. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9):4591-4603.
- (50) Nguyen LT, Duncan GS, Mirtsos C, Ng M, Speiser DE, Shahinian A et al. TRAF2 deficiency results in hyperactivity of certain TNFR1 signals and impairment of CD40-mediated responses. *Immunity* 1999; 11(3):379-389.
- (51) McWhirter SM, Pullen SS, Holton JM, Crute JJ, Kehry MR, Alber T. Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(15):8408-8413.
- (52) Lee HH, Dempsey PW, Parks TP, Zhu X, Baltimore D, Cheng G. Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(4):1421-1426.
- (53) Li YY, Baccam M, Waters SB, Pessin JE, Bishop GA, Koretzky GA. CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK and JNK in resting murine splenic B cells. *J Immunol* 1996; 157(4):1440-1447.
- (54) Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89(12):1092-1103.
- (55) Sutherland CL, Krebs DL, Gold MR. An 11-amino acid sequence in the cytoplasmic domain of CD40 is sufficient for activation of c-Jun N-terminal kinase, activation of MAPKAP kinase-2, phosphorylation of I kappa B alpha, and protection of WEHI-231 cells from anti-IgM-induced growth arrest. *J Immunol* 1999; 162(8):4720-4730.

- (56) Jabara H, Laouini D, Tsitsikov E, Mizoguchi E, Bhan A, Castigli E et al. The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching. *Immunity* 2002; 17(3):265-276.
- (57) Brown KD, Hostager BS, Bishop GA. Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J Biol Chem* 2002; 277(22):19433-19438.
- (58) Pype S, Declercq W, Ibrahimi A, Michiels C, Van Rietschoten JG, Dewulf N et al. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2000; 275(24):18586-18593.
- (59) Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, Rao G et al. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(3):1497-1502.
- (60) Tan J, Town T, Mullan M. CD40-CD40L interaction in Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2(4):445-451.
- (61) Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000; 288(5475):2351-2354.
- (62) Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J Immunol* 1998; 161(7):3225-3236.
- (63) Zhu N, Ramirez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA, Gold MR. CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *J Immunol* 2002; 168(2):744-754.
- (64) Aicher A, Shu GL, Magaletti D, Mulvania T, Pezzutto A, Craxton A et al. Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J Immunol* 1999; 163(11):5786-5795.
- (65) Tan J, Town T, Mullan M. CD45 inhibits CD40L-induced microglial activation via negative regulation of the Src/p44/42 MAPK pathway. *J Biol Chem* 2000; 275(47):37224-37231.
- (66) Barr TA, Heath AW. Functional activity of CD40 antibodies correlates to the position of binding relative to CD154. *Immunology* 2001; 102(1):39-43.

- (67) Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4):487-501.
- (68) Inui S, Kaisho T, Kikutani H, Stamenkovic I, Seed B, Clark EA et al. Identification of the intracytoplasmic region essential for signal transduction through a B cell activation molecule, CD40. *Eur J Immunol* 1990; 20(8):1747-1753.
- (69) Tone M, Tone Y, Fairchild PJ, Wykes M, Waldmann H. Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4):1751-1756.
- (70) Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 2003; 278(35):32801-32809.
- (71) Nguyen VT, Benveniste EN. Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275(31):23674-23684.
- (72) Nguyen VT, Walker WS, Benveniste EN. Post-transcriptional inhibition of CD40 gene expression in microglia by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1998; 28(8):2537-2548.
- (73) Tone M, Tone Y, Babik JM, Lin CY, Waldmann H. The role of Sp1 and NF-kappa B in regulating CD40 gene expression. *J Biol Chem* 2002; 277(11):8890-8897.
- (74) Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L et al. 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995; 3(12):1426.
- (75) Bajorath J, Chalupny NJ, Marken JS, Siadak AW, Skonier J, Gordon M et al. Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry* 1995; 34(6):1833-1844.
- (76) Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD et al. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem* 1996; 271(11):5965-5967.

- (77) Graf D, Muller S, Korthauer U, Van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 1995; 25(6):1749-1754.
- (78) Pound JD, Challa A, Holder MJ, Armitage RJ, Dower SK, Fanslow WC et al. Minimal cross-linking and epitope requirements for CD40-dependent suppression of apoptosis contrast with those for promotion of the cell cycle and homotypic adhesions in human B cells. *Int Immunol* 1999; 11(1):11-20.
- (79) Roselli M, Mineo TC, Basili S, Martini F, Mariotti S, Aloe S et al. Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(2):610-614.
- (80) Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan IC. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J Exp Med* 1995; 181(4):1293-1301.
- (81) Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993; 73(3):431-445.
- (82) Peitsch MC, Jongeneel CV. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int Immunol* 1993; 5(2):233-238.
- (83) Bajorath J, Marken JS, Chalupny NJ, Spoon TL, Siadak AW, Gordon M et al. Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 1995; 34(31):9884-9892.
- (84) Bajorath J, Aruffo A. Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. *Proteins* 1997; 27(1):59-70.
- (85) Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A et al. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 1995; 270(13):7025-7028.
- (86) Dilloo D, Brown M, Roskrow M, Zhong W, Holladay M, Holden W et al. CD40 ligand induces an antileukemia immune response in vivo. *Blood* 1997; 90(5):1927-1933.

- (87) French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* 1999; 5(5):548-553.
- (88) Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, Floettmann JE, Rowe M, Armitage RJ et al. CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator. *Oncogene* 1996; 13(10):2243-2254.
- (89) Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. CD40 and epithelial cells: across the great divide. *Immunol Today* 1998; 19(11):502-506.
- (90) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2(6):507-509.
- (91) Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; 259(5093):368-370.
- (92) Mackey MF, Gunn JR, Maliszewsky C, Kikutani H, Noelle RJ, Barth RJ, Jr. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol* 1998; 161(5):2094-2098.
- (93) Schattner EJ, Mascarenhas J, Bishop J, Yoo DH, Chadburn A, Crow MK et al. CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood* 1996; 88(4):1375-1382.
- (94) Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kipps TJ. Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 1998; 101(5):1133-1141.
- (95) Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 96(9):2917-2924.
- (96) Mendoza RB, Cantwell MJ, Kipps TJ. Immunostimulatory effects of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization. *J Immunol* 1997; 159(12):5777-5781.
- (97) Urashima M, Suzuki H, Yuza Y, Akiyama M, Ohno N, Eto Y. An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated *Salmonella typhimurium*. *Blood* 2000; 95(4):1258-1263.

- (98) Tolba KA, Bowers WJ, Hilchey SP, Halterman MW, Howard DF, Giuliano RE et al. Development of herpes simplex virus-1 amplicon-based immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98(2):287-295.
- (99) Burger JA, Mendoza RB, Kipps TJ. Plasmids encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and CD154 enhance the immune response to genetic vaccines. *Vaccine* 2001; 19(15-16):2181-2189.
- (100) Chen W, Yu Y, Shao C, Zhang M, Wang W, Zhang L et al. Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody. *Immunol Lett* 2001; 77(1):17-23.
- (101) Xiang R, Primus FJ, Ruehlmann JM, Niethammer AG, Silletti S, Lode HN et al. A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T cell-mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. *J Immunol* 2001; 167(8):4560-4565.
- (102) Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* 1993; 261(5126):1328-1330.
- (103) Mohan C, Shi Y, Laman JD, Datta SK. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 1995; 154(3):1470-1480.
- (104) Ostlie N, Milani M, Wang W, Okita D, Conti-Fine BM. Absence of IL-4 facilitates the development of chronic autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2003; 170(1):604-612.
- (105) Howard LM, Dal Canto MC, Miller SD. Transient anti-CD154-mediated immunotherapy of ongoing relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis induces long-term inhibition of disease relapses. *J Neuroimmunol* 2002; 129(1-2):58-65.
- (106) Chen FA, Williams SS, Fanslow WC, Bankert RB. Human antibody response in human peripheral blood leukocyte/severe combined immunodeficient chimeric model is dependent on B and T cell costimulation via CD40/CD40 ligand. *J Immunol* 1995; 155(6):2833-2840.
- (107) Santos-Argumedo L, Alvarez-Maya I, Romero-Ramirez H, Flores-Romo L. Enforced and prolonged CD40 ligand expression triggers autoantibody production in vivo. *Eur J Immunol* 2001; 31(12):3484-3492.

- (108) Boon L, Brok HP, Bauer J, Ortiz-Buijsse A, Schellekens MM, Ramdien-Murli S et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist monoclonal antibody against human CD40 is associated with altered B cell responses. *J Immunol* 2001; 167(5):2942-2949.
- (109) Davis JC, Jr., Totoritis MC, Rosenberg J, Sklenar TA, Wofsy D. Phase I clinical trial of a monoclonal antibody against CD40-ligand (IDEC-131) in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28(1):95-101.
- (110) Graca L, Le Moine A, Cobbold SP, Waldmann H. Antibody-induced transplantation tolerance: the role of dominant regulation. *Immunol Res* 2003; 28(3):181-191.
- (111) Xu H, Tadaki DK, Elster EA, Burkly LC, Berning JD, Cruzata F et al. Humanized anti-CD154 antibody therapy for the treatment of allograft rejection in nonhuman primates. *Transplantation* 2002; 74(7):940-943.
- (112) Vincenti F. New monoclonal antibodies in renal transplantation. *Minerva Urol Nefrol* 2003; 55(1):57-66.
- (113) Chang GJ, Liu T, Feng S, Bedolli M, O'Rourke RW, Schmidt G et al. Targeted gene therapy with CD40Ig to induce long-term acceptance of liver allografts. *Surgery* 2002; 132(2):149-156.
- (114) Moses AV, Williams SE, Strussenberg JG, Heneveld ML, Ruhl RA, Bakke AC et al. HIV-1 induction of CD40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas. *Nat Med* 1997; 3(11):1242-1249.
- (115) Chougnet C. Role of CD40 ligand dysregulation in HIV-associated dysfunction of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74(5):702-709.
- (116) Nikaido H. Outer Membrane. In: Neidherdt F, Ingraham J, Low K, agasanik B, Schaechter M, Umbarger H, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. . Washington, D.C. USA.: Amerainan Society for Microbiology, 1997: 29-47.
- (117) Santiviago CA, Toro CS, Hidalgo AA, Youderian P, Mora GC. Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium major porin, OmpD. *J Bacteriol* 2003; 185(19):5901-5905.
- (118) Venegas A, Gomez I, Zaror I, Yudelevich A. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(15):7721.

- (119) Agüero J, Mora G, Mroczenski-Willey MJ, Fernandez-Beros ME, Aron L, Cabello FC. Cloning, expression and characterization of the 36 KDa Salmonella typhi porin gene in Escherichia coli. Microb Pathog 1987; 3(6):399-407.
- (120) Arockiasamy A, Krishnaswamy S. Crystallization of the immunodominant outer membrane protein OmpC; the first protein crystals from Salmonella typhi, a human pathogen. FEBS Lett 1999; 453(3):380-382.
- (121) Benz R. Structure and function of porins from gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol 1988; 42:359-393.
- (122) Benz R, Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. Eur J Biochem 1988; 176(1):1-19.
- (123) Benz R. Structural requirement for the rapid movement of charged molecules across membranes. Experiments with tetraphenylborate analogues. Biophys J 1988; 54(1):25-33.
- (124) Hikita C, Satake Y, Yamada H, Mizuno T, Mizushima S. Structural and functional characterization of the OmpF and OmpC porins of the Escherichia coli outer membrane: studies involving chimeric proteins. Res Microbiol 1989; 140(3):177-190.
- (125) Inokuchi K, Mutoh N, Matsuyama S, Mizushima S. Primary structure of the ompF gene that codes for a major outer membrane protein of Escherichia coli K-12. Nucleic Acids Res 1982; 10(21):6957-6968.
- (126) Rocque WJ, McGroarty EJ. Isolation and preliminary characterization of wild-type OmpC porin dimers from Escherichia coli K-12. Biochemistry 1989; 28(9):3738-3743.
- (127) Struyve M, Moons M, Tommassen J. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. J Mol Biol 1991; 218(1):141-148.
- (128) Bosch D, de Boer P, Bitter W, Tommassen J. The role of the positively charged N-terminus of the signal sequence of E. coli outer membrane protein PhoE in export. Biochim Biophys Acta 1989; 979(1):69-76.
- (129) Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, Gonzalez C, Moreno J et al. Protection against Salmonella typhi infection in mice after immunization with outer

- membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12.d, Vi. *Infect Immun* 1988; 56(11):2953-2959.
- (130) Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Pelayo R, Gonzalez CR, Garcia JA et al. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 1992; 10(12):811-813.
- (131) Gonzalez CR, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Garcia JA, Blanco F et al. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol Immunol* 1993; 37(10):793-799.
- (132) Blanco F, Isibasi A, Raul GC, Ortiz V, Paniagua J, Arreguin C et al. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J Infect Dis* 1993; 25(1):73-80.
- (133) Isibasi A, Paniagua J, Rojo MP, Martin N, Ramirez G, Gonzalez CR et al. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 730:350-352.
- (134) Gonzalez CR, Mejia MV, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Ramirez G, Isibasi A. Immune response to porins isolated from *Salmonella typhi* in different mouse strains. *Arch Med Res* 1995; 26 Spec No:S99-103.
- (135) Paniagua-Solis J, Sanchez J, Ortiz-Navarrete V, Gonzalez CR, Isibasi A. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* OmpC peptide loops. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 141(1):31-36.
- (136) Puente JL, Juarez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 1995; 156(1):1-9.
- (137) Danese PN, Silhavy TJ. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 1998; 32:59-94.
- (138) Surrey T, Schmid A, Jahnig F. Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF. *Biochemistry* 1996; 35(7):2283-2288.
- (139) Rouviere PE, Gross CA. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev* 1996; 10(24):3170-3182.

- (140) Behrens S, Maier R, de Cock H, Schmid FX, Gross CA. The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J* 2001; 20(1-2):285-294.
- (141) Schafer U, Beck K, Muller M. Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem* 1999; 274(35):24567-24574.
- (142) Laird MW, Kloser AW, Misra R. Assembly of LamB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1994; 176(8):2259-2264.
- (143) Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 1999; 97(3):339-347.
- (144) CastilloKeller M, Misra R. Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. *J Bacteriol* 2003; 185(1):148-154.
- (145) Hofnung M. Expression of foreign polypeptides at the *Escherichia coli* cell surface. *Methods Cell Biol* 1991; 34:77-105.
- (146) Martineau P, Guillet JG, Leclerc C, Hofnung M. Expression of heterologous peptides at two permissive sites of the MalE protein: antigenicity and immunogenicity of foreign B-cell and T-cell epitopes. *Gene* 1992; 118(1):151.
- (147) Ronco J, Charbit A, Hofnung M. Creation of targets for proteolytic cleavage in the LamB protein of *E coli* K12 by genetic insertion of foreign sequences: implications for topological studies. *Biochimie* 1990; 72(2-3):183-189.
- (148) Clement JM, Charbit A, Martineau P, O'Callaghan D, Szmelcman S, Leclerc C et al. Bacterial vectors to target and/or purify polypeptides: their use in immunological studies. *Ann Biol Clin (Paris)* 1991; 49(4):249-254.
- (149) Szmelcman S, Clement JM, Jehanno M, Schwartz O, Montagnier L, Hofnung M. Export and one-step purification from *Escherichia coli* of a MalE-CD4 hybrid protein that neutralizes HIV in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3(9):859-872.
- (150) Martineau P, Charbit A, Leclerc C, Werts C, O'Callaghan D, Hofnung M. A genetic system to elicit and monitor antipeptide antibodies without peptide synthesis. *Biotechnology (N Y)* 1991; 9(2):170-172.

- (151) Leclerc C, Charbit A, Martineau P, Deriaud E, Hofnung M. The cellular location of a foreign B cell epitope expressed by recombinant bacteria determines its T cell-independent or T cell-dependent characteristics. *J Immunol* 1991; 147(10):3545-3552.
- (152) Leclerc C, Martineau P, van der WS, Deriaud E, Duplay P, Hofnung M. Induction of virus-neutralizing antibodies by bacteria expressing the C3 poliovirus epitope in the periplasm. The route of immunization influences the isotypic distribution and the biologic activity of the antipoliovirus antibodies. *J Immunol* 1990; 144(8):3174-3182.
- (153) van der WS, Charbit A, Leclerc C, Mimic V, Ronco J, Girard M et al. Critical role of neighbouring sequences on the immunogenicity of the C3 poliovirus neutralization epitope expressed at the surface of recombinant bacteria. *Vaccine* 1990; 8(3):269-277.
- (154) Charbit A, Molla A, Ronco J, Clement JM, Favier V, Bahraoui EM et al. Immunogenicity and antigenicity of conserved peptides from the envelope of HIV-1 expressed at the surface of recombinant bacteria. *AIDS* 1990; 4(6):545-551.
- (155) Tommassen J, Agterberg M, Janssen R, Spierings G. Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. *Zentralbl Bakteriol* 1993; 278(2-3):396-406.
- (156) Wong RS, Wirtz RA, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF as an expression vector for foreign epitopes: the effects of positioning and length on the antigenicity of the epitope. *Gene* 1995; 158(1):55-60.
- (157) Yepez SH, Pando RH, Argumedo LS, Paredes MV, Cueto AH, Isibasi A et al. Therapeutic efficacy of an *E coli* strain carrying an ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OMPC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003; 21(5-6):566-578.
- (158) Cole ST, Braun G, Sonntag I, Henning U. Expression in *Escherichia coli* K12 of the cloned genes for a major outer membrane protein (OmpA protein) from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*. *Ann Microbiol (Paris)* 1982; 133(2):209-213.
- (159) Cole ST, Sonntag I, Henning U. Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*,

- Enterobacter aerogenes, and Serratia marcescens. J Bacteriol 1982; 149(1):145-150.
- (160) Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- (161) Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. EMBO J 1992; 11(12):4313-4321.
- (162) Arockiasamy A, Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from Salmonella typhi for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. Anal Biochem 2000; 283(1):64-70.
- (163) Erdei J, Forsgren A, Naidu AS. Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in Escherichia coli. Infect Immun 1994; 62(4):1236-1240.
- (164) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254.
- (165) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985; 150(1):76-85.
- (166) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(259):680-685.
- (167) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology 1992; 24:145-149.
- (168) Goding JW, Layton JE. Antigen-induced co-capping of IgM and IgD-like receptors on murine B cells. J Exp Med 1976; 144(3):857.
- (169) Mazzei T, Tonelli F, Mini E, Mazzoni P, Pesciullesi A, Valanzano R et al. Flow cytometric analysis of DNA ploidy and cell proliferation activity in colorectal carcinoma. Anticancer Res 1995; 15(5B):2247-2253.

- (170) Epstein AM, Barr YM. Characteristics and mode of growth of a tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. J Nat Cancer Inst 1965; 34(231):240.
- (171) Epstein AM, Achong BG, Barr YM, Zajac B, Henle G, Henle W. Morphological and virological investigations on culture burkitt tumor lymphoblasts (Strain Raji). J Nat Cancer Inst 1966; 37:547-559.
- (172) Epstein M, Barr Y. Cultivation *in vitro* of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. Lancet 1964; 1:252-253.
- (173) Noelle RJ, Marshall L, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA et al. Role of contact and soluble factors in the growth and differentiation of B cells by helper T cells. Adv Exp Med Biol 1992; 323:131-138.
- (174) Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. Trends Biochem Sci 1998; 23(2):74-79.
- (175) Smith SJ, Jones NS, Shakib F. The prevalence of IgG1 and IgG4 autoantibodies to IgE in patients with allergic and non-allergic rhinitis. Clin Otolaryngol 1995; 20(6):540-543.
- (176) Bajorath J, Bowen MA, Aruffo A. Molecular model of the N-terminal receptor-binding domain of the human CD6 ligand ALCAM. Protein Sci 1995; 4(8):1644-1647.
- (177) Secundino I, Paniagua-Solis J, Isibasi A, Sanchez J. A cloning vector for efficient generation of cholera toxin B gene fusions for epitope screening. Mol Biotechnol 1999; 11(1):101-104.
- (178) Ellmark P, Ottosson C, Borrebaeck CA, Malmberg Hager AC, Furebring C. Modulation of the CD40-CD40 ligand interaction using human anti-CD40 single-chain antibody fragments obtained from the n-CoDeR phage display library. Immunology 2002; 106(4):456-463.
- (179) Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. Int J Clin Lab Res 1996; 26(3):143-159.
- (180) Strauch KL, Johnson K, Beckwith J. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of Escherichia coli at high temperature. J Bacteriol 1989; 171(5):2689-2696.

- (181) Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD, Brown MH et al. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* 2000; 13(2):233-242.
- (182) McWhirter SM, Pullen SS, Werneburg BG, Labadia ME, Ingraham RH, Crute JJ et al. Structural and biochemical analysis of signal transduction by the TRAF family of adapter proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64:551-562.
- (183) Ray A, Chatterjee NS, Bhattacharya SK, Biswas T. Porin of *Shigella dysenteriae* enhances mRNA levels for Toll-like receptor 2 and MyD88, up-regulates CD80 of murine macrophage, and induces the release of interleukin-12. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 39(3):213-219.
- (184) Jeannin P, Renno T, Goetsch L, Miconnet I, Aubry JP, Delneste Y et al. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* 2000; 1(6):502-509.
- (185) Galdiero M, Galdiero M, Finamore E, Rossano F, Gambuzza M, Catania MR et al. *Haemophilus influenzae* porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* 2004; 72(2):1204-1209.
- (186) Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 2002; 168(4):1533-1537.
- (187) Galdiero M, Vitiello M, Sanzari E, D'Isanto M, Tortora A, Longanella A et al. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activate the transcription factors activating protein 1 and NF-kappaB through the Raf-1-mitogen-activated protein kinase cascade. *Infect Immun* 2002; 70(2):558-568.
- (188) Gupta S, Kumar D, Vohra H, Ganguly NK. Involvement of signal transduction pathways in *Salmonella typhimurium* porin activated gut macrophages. *Mol Cell Biochem* 1999; 194(1-2):235-243.
- (189) Muller A, Gunther D, Dux F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J* 1999; 18(2):339-352.
- (190) Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, McWhirter SM, Everdeen DS, Alber T et al. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors

(TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 1999; 38(31):10168-10177.

- (191) Ruiz-Perez F, Leon-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M et al. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect Immun* 2002; 70(7):3611-3620.
- (192) Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther* 2003; 10(1):1-13.
- (193) Mauri C, Mars LT, Londei M. Therapeutic activity of agonistic monoclonal antibodies against CD40 in a chronic autoimmune inflammatory process. *Nat Med* 2000; 6(6):673-679.
- (194) Vonderheide RH, Dutcher JP, Anderson JE, Eckhardt SG, Stephans KF, Razvillas B et al. Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19(13):3280-3287.
- (195) Lefrancois L, Altman JD, Williams K, Olson S. Soluble antigen and CD40 triggering are sufficient to induce primary and memory cytotoxic T cells. *J Immunol* 2000; 164(2):725-732.
- (196) Hixon JA, Blazar BR, Anver MR, Wiltout RH, Murphy WJ. Antibodies to CD40 induce a lethal cytokine cascade after syngeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(3):136-143.
- (197) Huang HI, Wu PY, Teo CY, Chen MN, Chen YC, Silin D et al. Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand. *Int J Cancer* 2004; 108(5):696-703.

A *Salmonella typhi* OmpC fusion protein expressing the CD154 Trp140–Ser149 amino acid strand binds CD40 and activates a lymphoma B-cell line

MARIO I. VEGA,*† LEOPOLDO SANTOS-ARGUMEDO,† SARA HUERTA-YEPEZ,*† ROSENDO LURÍA-PEREZ,*† VIANNEY ORTIZ-NAVARRETE,† ARMADO ISIBASI† & CESAR R. GONZÁLEZ-BONILLA* *Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología 'Dr Daniel Méndez Hernández' Centro Médico 'La Raza', México, †Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico, and ‡Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico

SUMMARY

CD154 is a type II glycoprotein member of the tumour necrosis factor (TNF) ligand family, which is expressed mainly on the surface of activated T lymphocytes. The interaction with its receptor CD40, plays a central role in the control of several functions of the immune system. Structural models based on the homology of CD154 with TNF and lymphotoxin indicate that binding to CD40 involves three regions surrounding amino acids K143, R203 and Q220, and that strands W140–S149 and S198–A210 are critical for such interactions. Also, it has been reported that two recombinant CD154 fragments, including amino acid residues Y45–L261 or E108–L261 are biologically active, whereas other polypeptides, including S149–L261, are not. Therefore, we decided to construct a fusion protein inserting the W140–S149 amino acid strand (WAEKGYTMS) in an external loop of the outer membrane protein C (OmpC) from *Salmonella enterica* serovar Typhi and assess its ability to bind CD40 and activate B cells. The sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis demonstrated that the chimeric OmpC–gp39 protein conserved its ability to form trimers. Binding to CD40 was established by three variants of enzyme-linked immunosorbent assay, a direct binding assay by coating plates with a recombinant CD40–Fc protein and through two competition assays between OmpC–gp39 and recombinant CD154 or soluble CD40–Fc. Flow cytometry analysis demonstrated that OmpC–gp39 increased the expression levels of major histocompatibility complex II, CD23, and CD80, in Raji human B-cell lymphoma similarly to an antibody against CD40. These results further support that the CD154/CD40 interaction is similar to the TNF/TNF receptor. This is the first report of a bacterial fusion protein containing a small amino acid strand from a ligand that is able to activate its cognate receptor.

INTRODUCTION

CD154 (CD40L, TRAP, T-BAM or gp39) is a 39 000 MW glycoprotein member of the tumour necrosis factor (TNF) ligand family,¹ expressed as a type II integral membrane protein mainly on the surface of activated T lymphocytes, and also found in many other cells.^{2–6} CD154 is the ligand for CD40, a member of the TNF receptor family expressed mainly in

professional antigen presenting cells. The CD154/CD40 interaction plays a central role in the control of both humoral and cellular immunity.^{7–11} The importance of such interaction is demonstrated by the X-linked hyper-immunoglobulin M (IgM) syndrome (HIGM-1), a genetic disorder consisting of CD154 mutations, characterized by impaired thymus-dependent humoral immune responses, high serum concentrations of IgM, decreased amounts of IgG, IgA and IgE, and absence of germinal centres in lymph nodes.^{12–15} B lymphocytes isolated from these patients produce immunoglobulin isotype switching if treated with anti-CD40 monoclonal antibodies or soluble CD154. Furthermore, CD154 knock-out mice suffer analogous alterations to HIGM-1.^{16,17}

The identification of CD154 regions involved in the interaction with CD40 derives from alignment studies with TNF and lymphotoxin. TNF/TNF receptor (TNFR) crystallographic data,

Received 5 February 2003; revised 19 June 2003; accepted 30 June 2003.

Correspondence: Dr M. I. Vega, Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología 'Dr Daniel Méndez Hernández' Centro Médico 'La Raza', IMSS, PO Box 15-095, México. E-mail: bonilla@sni.conacyt.mx

site directed mutagenesis, sequence analysis of CD154 in patients with HIGMX-1 and crystallography of CD154. Although the complete crystallographic model of CD154 remains unknown, the crystal structure of the CD154 extracellular fragment confirmed that the molecule forms a trimer with overall folding similar to other members of the TNF family, but with differences in several loops including those involved in binding to CD40.¹⁸ The CD154 sequence analysis in patients with HIGMX-1 allowed the identification of several amino acid residues that bind to CD40,¹⁹ most of the amino acids involved in the interaction have been predicted by site-directed mutagenesis, accordingly to the TNF- α /TNFR crystallographic data,^{20,21} suggesting that it involves at least three clusters from two adjacent CD154 monomers around amino acids K143, R203 and Q220.^{20,22} Three CD154 recombinant protein fractions provided additional information of the CD154/CD40 interaction. A soluble 29 000 MW fragment including residues Y45–L261, was able to induce proliferation and isotype switching in B lymphocytes from patients with HIGMX-1 when administered in combination with interleukin (IL)-4 or IL-10.²³ A smaller 18 000 MW fragment (E108–L261), which was able to form trimers, bound soluble CD40, and induced B-cell proliferation, differentiation and rescue from apoptosis,²⁴ and finally a 14 000 MW recombinant CD154 fraction including residues S149–L261 which bound CD40 but was not functional. These observations suggest that amino acid W140–S149 must be critical in the interaction with CD40 and are consistent with the assumption that a trimeric structure is necessary for CD154 function. At least three isoforms of CD154 are present on the surface of T lymphocytes, a full length 39 000 MW protein and two shorter p31 and p18 forms which are produced by proteolytic cleavage and associate in heterotrimers with the full length CD154. The functional significance of these full length homotrimeric and heterotrimeric structures remains unclear, but it is known that surface molecules are primarily homotrimers and heterotrimers of full length and truncated p31 that are biologically active.²⁵

Nevertheless, it has been recently demonstrated that CD154 has to cluster in a similar way to other cellular surface receptors, moving through the cell membrane in rafts constituted by detergent-insensitive glycosphingolipid rich domains, as a prerequisite for the engagement with CD40.²⁶ Therefore, it could be anticipated that varying degrees of clustering might lead to different types of signalling events. The diverse biological activities of different monoclonal antibodies against CD154 or CD40 are consistent with this assumption,²⁷ and allow to hypothesize that a fusion protein containing a CD154 region involved in the CD154/CD40 interaction could bind CD40 and exhibit biological activity.

In this study we report the construction and characterization of a hybrid protein containing CD154 amino acid residues W140–S149 fused to an external loop of the OmpC porin from *Salmonella enterica* serovar Typhi. This CD154 strand was selected based on the crystallographic model of the TNF/TNFR interaction,²⁰ and the mutagenesis analysis of CD154, that predicted the main residues involved in CD40 binding.²¹ The OmpC protein was used as carrier of the CD154 sequence because it has been demonstrated to contain permissive sites where foreign sequences can be inserted and expressed as fusion

proteins without disrupting its tertiary structure.²⁸ The results confirm that CD154 residues W140–S149 are important for CD40 binding and are able to activate B lymphocytes when expressed in the context of the OmpC from *S. enterica* serovar Typhi.

MATERIAL AND METHODS

Genetic engineering

Bacterial strains and culture conditions: *Escherichia coli* DH5 α TM: (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) Φ F80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA*–*argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(*r_k*, *m_k*⁺) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1*.

Escherichia coli UH302: OmpC[–], OmpF[–].^{29,31} Bacterial strains transformed with plasmids pST13 and pST13-gp39 were cultured in Luria-Bertani agar plates (Gibco, BRL, Life Tech, Gaithersburg, MD) at 37° with 100 μ g/ml ampicillin (Sigma, St. Louis, MO).

Plasmids

pST13. Contains the *ompC* gene from *Salmonella enterica* serovar Typhi.³²

pST13–gp39. Reported in this work.

Insertion of the CD154 140–149 amino acid sequence in the *ompC* gene

The cloning strategy is shown in Fig. 1. According to TNF/TNFR interaction models and the alignment of the TNF with CD154 (Fig. 1a), the CD154 W140–S149 amino acid sequence (WAEKGYTMS) was inserted by polymerase chain reaction (PCR) in the 666–685 bp gene segment of the *S. enterica* serovar Typhi *ompC*, which according to a prediction model, encodes for the OmpC loop 5.³³ Briefly, four primers were designed using the reported *ompC* sequence.³² Two external primers, the forward OMPC1 (5' ATG AAA GTT AAA GTA CTG 3', includes amino acids 1–5) and reverse OMPC2 (5' CTG GTA AAC CAG ACC CAG 3', includes amino acids 371–378), which amplify the complete *ompC* gene from 1 to 1133 bp; and two internal hybrid primers containing *ompC* loop five plus CD154 sequences, the forward gp39I [5' TCC TGG GCT GAA AAA GGT TAC TAC ACT ATG TCC CTG TAT GGT AAC GGC GAT 3', includes amino acids 236–241 of *ompC* (LYGNGD) (bold) and 140–149 of CD154 (normal font)] and reverse gp39II [5' GGA CAT AGT GTA GTA ACC TTT TTC AGC CCA GGA CTG ATC GGC AGT ACG TTT AGA 3', includes amino acids 221–227 of *ompC* (SKRTADQ) (bold) and 140–149 of CD154 (normal font)]. Using plasmid pST13 as template (kindly provided by Dr Felipe Cabello, Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College Valhalla, New York) two amplification rounds were performed separately. The first amplification was performed with primers OMPC1/gp39II or OMPC2/gp39I under the following conditions: 1 μ M of primers, 100 ng of plasmid pST13, 200 μ M dinitrotriphosphate, 1 U Taq DNA polymerase, 5 mM MgCl₂, and H₂O up to 100 μ l. One cycle at 95° for 5 min, 45° for 1 min, and 72° for 1 min; 29 cycles at 95° for 1 min, 45° for 70 seconds, and 72° for 1 min; and one cycle at 95° for 1 min, 45° for 1 min, and 72° for 4 min. This first amplification yielded two moieties of the *ompC* gene. Primers OMPC1/gp39II amplified the 5' moiety of the *ompC* (420 bp), which has the CD154

encoding sequence in the 3'-end, whereas primers OMPC2/gp39I generated the 3'-moiety product (713 bp) with the CD154 sequence in the 5'-end. The second amplification round was performed using 1 µg of each DNA product from the first amplification as template with 1 pM of primers OMPC1/OMPC2, under the following conditions: one cycle at 95° for 3 min, 50° for 70 seconds, and 72° for 2 min; 29 cycles at 95° for 1 min, 50° for 70 s, and 72° for 1 min; and one cycle at 95° for 1 min, 50° for 70 s, and 72° for 4 min. This amplification produced a 1.1 kb fusion product in which the ompC 666–685 bp segment was substituted by the CD154 sequence. The chimeric amplicon was digested with *KpnI* and was reinserted in pST13 and transformed in *Escherichia coli* UH302 (a porinless bacterial mutant). The construction was verified by PCR using a pair of internal initiators, forward gp39III (5' GCT GAA AAA GGT TAC TAC 3', includes amino acids 140–148 of CD154) and reverse gp39IV (5' GTA GTA ACC TTT TTC AGC 3', includes amino acids 141–149 from CD154).

Purification of the recombinant OmpC-gp39 fusion protein and native OmpC

Purification of the OmpC-gp39 and OmpC recombinant proteins was performed with some modification to the method described by Arockiasamy.³⁴ Briefly, *E. coli* UH302 transformed with pST13 or pST13-gp39 were cultured in 4 l of Luria broth (Gibco, BRL) for 16 hr, shaken at 37° and 200 r.p.m. The bacteria were harvested by centrifugation at 7969 g for 30 min at 4° (Sorvall RC 5B plus centrifuge, rotor GSA). The bacterial pellet was washed twice with 0.9% saline solution and centrifuged at 7969 g for 30 min and the pellet was incubated overnight at -20°. The pellet was then thawed at 4°, suspending it in 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), the cells were disrupted using a French press at 20 000 SI, with 1 ml/min flux. Undisrupted cells were removed by centrifugation (9000 g, rotor SS34 Sorvall RC 5B plus centrifuge, Newtown, CT) and the supernatant was centrifuged at 61 740 g for 90 min at 20° (Beckman XL-100K ultracentrifuge, rotor 701 Ti; Beckman Instrument Inc., Palo Alto, CA). The pellet containing the crude membrane was thoroughly suspended in 100 ml of Buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 10 mM MgCl₂, and 2% sodium dodecyl sulphate (SDS)) and incubated at 37° for 18 hr in a shaker. The suspension was centrifuged at 17 211 g for 30 min at 20° and the pellet was collected. This pellet was resuspended in 28 ml of Buffer II (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% SDS, and 0.05% β-mercaptoethanol). This suspension was incubated at 37° for 2 h and centrifuged at 17 211 g for 30 min at 20°. The pellet from the above step was again resuspended in 9 ml of Buffer III (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.4 M NaCl, and 0.05% β-mercaptoethanol) and incubated for 2 hr at 37°. The suspension was then centrifuged at 17 211 g for 20 min at 20° and the supernatant containing porins was collected. The above step was repeated twice with 2 ml of Buffer III. The collected supernatants were then pooled and dialysed against 10 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES at 25° for 20 hr,³⁵ the protein concentration was determined³⁶ the samples were aliquoted, irradiated at 18 rad/15 min (Gamma-cell) and stored at -20° until used. Lipopolysaccharide (LPS) content was determined by the *Limulus polyphemus* coagulation assay (E-TOXATE Kit, Sigma 210-A1).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western blot

Once purified as described above, the OmpC and OmpC-gp39 recombinant proteins were analysed by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions (with or without boiling for 10 min). Electrophoresis was carried out at 35 mA of constant electrical current,³⁷ (miniPROTEAN 3 cell apparatus, BIO-RAD with 1 mm thick gels, BIO-RA Laboratories, Hercules, CA). The stacking and separating gels contained 4 and 12% acrylamide, respectively. A 20-µl sample containing 10 µg of protein was applied to each well using prestained molecular weight standards (BIO-RAD), and proteins were then stained with Coomassie blue dye. The Western blot was performed by transferring the proteins to nitrocellulose membranes (Nitro-Bind, MSI, Westboro, MA), at 400 mA for 1.5 hr by using a Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD) with 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% (v/v) methanol pH 8.3.³⁸ Membranes were blocked with 5% phosphate-buffered saline (PBS)-non-fat dried milk for 1 hr at 37° and incubated with a cocktail of monoclonal antibodies against OmpC (kindly provided by Dr Felipe Cabello, Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College, NY) diluted 1 : 5000 in PBS-5% milk, for 1 hr at 37°, and then incubated with goat anti-mouse-horseradish peroxidase (HRP) conjugate at 1 : 1000 dilution for 1 hr at 37°. Finally 4-chloro-2-naphthol and 0.08% H₂O₂ substrate was added, between incubations the membranes were washed three times with PBS-0.1% Tween 20.

Evaluation of OmpC-gp39 binding to purified CD40

The ability of the OmpC-gp39 fusion protein to bind CD40 was assessed by three different variants of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Inhibition assays. The ability of OmpC-gp39 to inhibit the CD154/CD40 binding was assessed as following. Microtitre plates (Costar, Cambridge, MA) were coated with 2 µg/ml of CD40-Fc recombinant protein (Alexis Co. rCD40-Fc, 522-016-CO50) diluted in 0.2 M PBS pH 7.4 in a final volume of 100 µl/well, incubating overnight at 4°. The plates were then blocked with 100 µl of PBS, 1% (v/v) fetal bovine serum and 2% (v/v) bovine serum albumin (FBS-BSA-PBS), for 2 hr at 37°, then the plates were incubated with a 5-µg/ml human recombinant CD154 (rhCD154, 522-015, Alexis Co.) solution in PBS for 1 hr at 37°. Inhibitions were performed preincubating the rhCD154 with increasing concentrations of OmpC, OmpC-gp39, or a monoclonal antibody against CD40 (0.8–50 µg/ml). Then the plates were incubated with a monoclonal antibody against CD154 (Alexis Co. ANC-353-020) and then with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate diluted 1 : 1000 for 1 hr at 37°. Colour was obtained with an OPD developing solution, arrested with H₂SO₄ and the OD measured at 492 nm using an ELISA reader (Beckman DU600). Between incubations the plates were washed three times with PBS, 0.01% (v/v) Tween 20 (TPBS). **OmpC-gp39/CD40 binding assays.** The ability of OmpC-gp39 to bind CD40 was assessed as following. Microtitre plates were coated with serial double dilutions of OmpC or OmpC-gp39 starting with 50 µg/ml (0.4–50 µg/ml in 0.2 M PBS pH 8.4 in a final volume of 100 µl/well), incubating overnight at 4°. After blocking as described above, a recombinant human CD40-Fc fusion protein

was added at a final concentration of 2 µg/ml diluted in 100 µl of BSA-PBS and the plates were incubated for 1 hr at 4°C. Finally, a mouse anti-human IgG peroxidase-conjugate antibody (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) was added in 100 µl diluted 1 : 1000 and the plates were further incubated for 1 hr at 37°C and then developed with *o*-phenylenediamine (OPD) in citrate buffer pH 5.0, the reaction was arrested and the colour measured as described above. Between incubations the plates were washed three times with TPBS.

Competition assays. The ability of CD154 to compete with OmpC-gp39 for the binding with CD40 was evaluated as following. Microtitre plates were coated with CD40-Fc (0.4–50 µg/ml), incubated with OmpC-gp39 or OmpC (10 µg/ml), or with these proteins mixed with rhCD154 (5 µg/ml), then with a cocktail of monoclonal antibodies against OmpC (diluted 1 : 1000) (kindly provided by Dr Felipe Cabello), and then with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Finally, the ability of OmpC-gp39 to compete with CD154 for the binding with CD40 was evaluated as following. Microtitre plates were coated with CD40-Fc, incubated with variable concentrations of rhCD154 (0.4–25 µg/ml), or with a mixture the rhCD154 with OmpC or OmpC-gp39 (10 µg/ml). Then, the plates were incubated with a monoclonal antibody against CD154, and revealed with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. The rest of the methodological procedures were performed as described above.

Cell line cultures

The Raji cell line (human Burkitt's lymphoma) was maintained at 37°C in 5% CO₂ in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, glutamine and antibiotics as described previously.³⁹

Evaluation of OmpC-gp39 binding to B cells

The ability of OmpC-gp39 fusion protein to bind the Raji B-cell lymphoma line was assessed by flow cytometry. Briefly, the OmpC-gp39 and OmpC proteins were first conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma) as described by Goding.⁴⁰ Raji cells were cultured in 12-well microculture plates (Costar) (1×10^6 cells/well) and incubated with OmpC-gp39-FITC or OmpC-FITC conjugates (50 µl of a 100-µg/ml in BSA-PBS). After 1-hr incubation at room temperature the cells were resuspended in 400 µl of BSA-PBS and the cell suspension (1×10^4 cells) were analysed in a Flow cytometer (FACS-Vantage SE System, Becton Dickinson) and analysed with the Lysis II (Ver 1.1) software (5000 events FL1). Inhibition assays using an anti-CD40 antibody (1 µg/ml) or competition with unlabelled OmpC or OmpC-gp39 (20 µg/ml) were also performed. All data were analysed using SPSS for Windows⁴¹ and $P \leq 0.05$ was considered as significant.

OmpC-gp39 ability to activate B cells

The ability of the OmpC-gp39 fusion protein to activate Raji B lymphoma cells was assessed by flow cytometry as described by Ranheim.⁴¹ Briefly, Raji B cells were cultured in 12-well microculture plates (Costar; 1×10^6 cells/well) and incubated with purified OmpC-gp39 or OmpC at a final concentration of 5, 10, 20 and 50 mg/ml. As positive controls, Raji cells were cultured with an activating anti-CD40 antibody (1 µg/ml, PharMingen, San Jose, CA) plus IL-4 (100 U/ml) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Other controls consisted of cells

cultured with purified OmpC-gp39 mixed with an inhibiting anti-CD40 monoclonal antibody for 18 hr in the presence of IL-4 (1 µg/ml, PharMingen). After 18 hr incubation at 37°C in 5% CO₂, the cells were harvested, transferred to 3-ml tubes and washed twice with BSA-PBS by centrifugation at 300 g at 4°C, and resuspended in 0.5 ml of BSA-PBS. Then, different monoclonal antibodies were added to the tubes, 5 µl (0.1 mg/ml) of anti-CD23, CD80 or major histocompatibility complex II (MHC-II), which were conjugated to FITC (BD-PharMingen) and the cells were further incubated at room temperature for 30 min in the dark. The cells were washed twice with BSA-PBS and the fluorescence was determined in 400 µl of the cell suspension (1×10^4 cells) using a flow cytometer and analysed with the Lysis II (Ver 1.1) software (5000 events FL1). Controls also included B Raji cells cultured with 8–10 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) from *S. minnesota* (Sigma-Aldrich).

RESULTS

Construction and expression of the fusion OmpC-gp39 protein

The human CD154 W140-S149 polypeptide, which was inserted in *S. enterica* serovar Typhi OmpC, was selected based on the following: (1) the crystallographic model of the TNF/TNFR interaction,²⁰ which is highly similar to CD154/CD40 and shows that two clusters of TNF amino acid residues, S198-A210 and Y140-Met148, are in close contact with TNFR; (2) the identification of CD154 mutations in patients with HIGMX-1 and site-directed mutagenesis experiments, which identified CD154 amino acid residues K143, Y145, Y146, R203 and Q220 as critical in the interaction with CD40;^{20,22} and (3), the description of three soluble CD154 recombinant fractions, including Y45-L261, E108-L261, and S149-L261 the only ones with demonstrated biological activity. An alignment of TNF, LT and CD154 revealed that the CD154 W140-S149 amino acids show homology with the other two proteins (Fig. 1a).

Therefore, the CD154 W140-S149 (WAEGGYTMS) amino acid sequence was substituted into the fifth loop of the *S. enterica* serovar Typhi OmpC and expressed in the porinless *E. coli* UH302 strain. The OmpC-gp39 fusion protein was obtained through PCR, in two amplification rounds. In the first amplification, two moieties of the *ompC* gene were obtained using plasmid pST13 (contains the *ompC* from *S. enterica* serovar Typhi) as template, and hybrid primers containing CD154 and OmpC sequences; the OmpC loop five sequence was selected according to a prediction model described elsewhere.³³ The first amplification generated two products (420 bp and 713 bp) (Fig. 2a, lanes 2 and 3), which could hybridize through the CD154 sequence and were fused in a second amplification round using primers for the complete *ompC* gene (1113 bp) (Fig. 2a, lane 4). The resulting hybrid product was digested with *KpnI-KpnI* and substituted by the *KpnI-KpnI* fragment of the parental plasmid pST13, resulting in plasmid pST13-gp39 (Fig. 2b, lane 6).

Plasmid pST13-gp39 was transformed in the porinless *E. coli* UH302 strain and production of the OmpC-gp39 fusion protein was confirmed by SDS-PAGE under reducing conditions and without boiling the samples (Fig. 2c). Outer membrane extracts

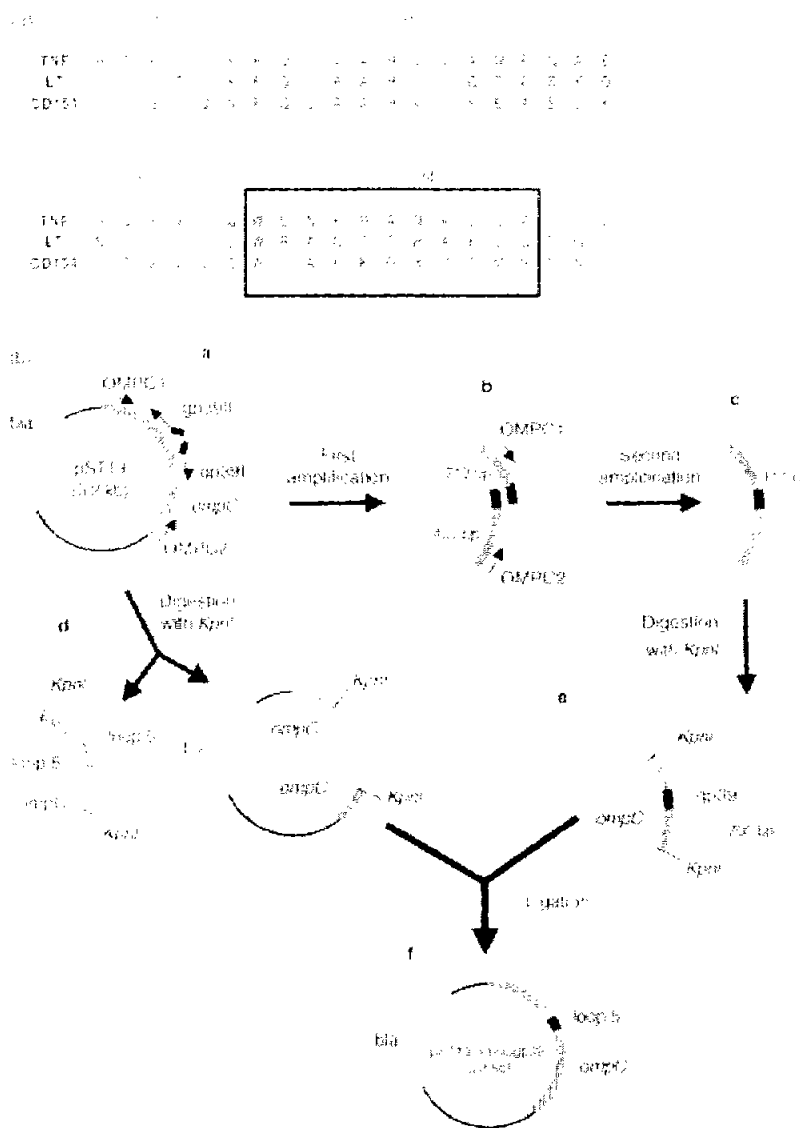


Figure 1. Construction of the OmpC-gp39 fusion protein. (a) Alignment of CD154 with TNF and leukotriene (LT). (b) Insertion of the CD154 140–149 amino acid sequence in the ompC gene. The CD154 W140–S149 amino acid sequence was inserted by PCR in the fifth loop of OmpC from *S. enterica* serovar Typhi. Using plasmid pST13 as template a first amplification was performed with primers OMPC1/gp39II or OMPC2/gp39I. This amplification yielded two moieties of the ompC gene in which CD154 sequences were included. **b** The second amplification round was performed using both DNA products as template with primers OMPC1/OMPC2. **c** This amplification produced a fusion product in which the ompC 666–685 bp segment was substituted by the CD154 sequence. **d** Plasmid pST13 was digested with *KpnI*. **e** The PCR product was digested with *KpnI*. **f** The digested fragment was reinserted in pST13 and transformed in *E. coli* UH302.

from *E. coli* UH302–pST13 revealed the OmpC expected 108 000 MW and 36 000 MW bands (Fig. 2c, lanes 1 and 2) (reducing and non-reducing conditions, respectively), demonstrating that the native porin is able to form trimers. Extracts from *E. coli* UH302–pST13–gp39 showed a slightly larger ≈ 40 000 MW protein that was also able to form trimers (Fig. 2c, lanes 3 and 4). This difference in molecular mass may be attributed to the amino acid changes in OmpC–gp39. This unexpected electrophoretic pattern has been reported in other recombinant proteins containing. Interestingly, a compar-

ison of the electrophoretic patterns of both OmpC and OmpC–gp39 suggests that the expression of the OmpC–gp39 fusion protein is reduced as compared with the native OmpC protein (Fig. 2c, lanes 2 and 4). This result is consistent with a similar fusion protein in which a foreign sequence was inserted in the fifth loop of OmpC,⁴² and may be explained by low efficiency in codon usage, but this issue needs to be further analysed. However, the Western blot using a cocktail of monoclonal antibodies against OmpC was consistent with the electrophoretic pattern (Fig. 2d). The insertion of the W140–S149 amino

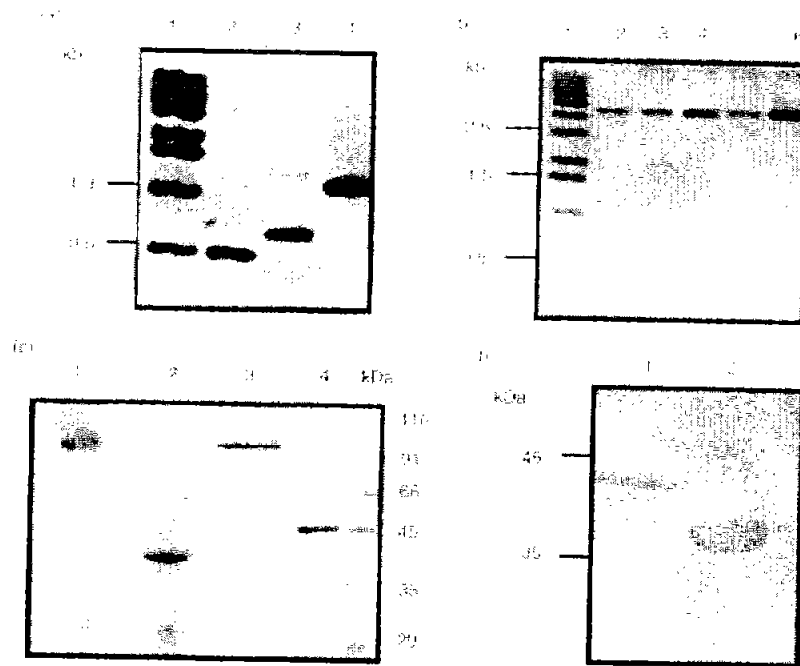


Figure 2. Generation of the OmpC-gp39 synthetic gene. (a) Amplifications were performed as described in material and methods. Lane 1, 1000 kb ladder; lane 2, 420 bp product bearing the gp39 sequence in the 5' end; lane 3, 3713 bp product bearing the gp39 sequence in the 5' end; lane 4, fusion. (b) Insertion of the *KpnI*-*KpnI* fragment in plasmid pST13. Lane 1, 1000 kb ladder; lanes 2, 4 and 5, digestion with *KpnI* clones without insert. Lane 3 and 6, clone with insert (700 bp). (c) Electrophoretic pattern of OmpC and OmpC-gp39. *E. coli* UH302 was transformed with plasmids pST13 or pST13-gp39, outer membrane proteins (omps) were obtained and electrophoresed as described in Materials and Methods. Lane 1, *E. coli* UH302-pST13 non-reducing conditions; lane 2, same strain under reducing conditions; lane 3, *E. coli* UH302-pST13-gp39 under non-reducing conditions; lane 4, same strain under reducing conditions. (d) Western blot analysis of OmpC and OmpC-gp39. Western blot was performed as described in Materials and Methods. The porin was revealed with a cocktail of monoclonal antibodies against OmpC. Lane 1, outer membrane proteins from *E. coli* UH302 pST13-gp39; lane 2, omps from *E. coli* UH302 pST13.

acid strand was further confirmed by PCR employing primers with the CD154 sequence (data not shown).

The OmpC-gp39 fusion protein binds to purified CD40

The ability of the purified OmpC-gp39 fusion protein to bind CD40 was assessed by several variants of ELISA. First, the property of OmpC-gp39 to inhibit the CD154/CD40 interaction was analysed. For this purpose, microtitre plates were coated with CD40-Fc, incubated with rhCD154, and then incubated with a monoclonal antibody against CD154 and with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Inhibitions were performed by preincubating the rhCD154 with increasing concentrations of OmpC, OmpC-gp39 or a monoclonal antibody against CD40. Figure 3(a) shows that, in contrast to OmpC, only the OmpC-gp39 and the monoclonal antibody against CD40 were able to inhibit the rhCD154 binding to the CD40-Fc coated in the plate in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$).

Then, a direct binding assay between OmpC-gp39 and CD40 was performed, coating microtitre plates with OmpC-gp39 or OmpC, which were then incubated with a recombinant CD40 fused to the human IgG Fc fraction (CD40-Fc), and with a mouse antihuman IgG Fc-HRP conjugate (control plates included wells without CD40-Fc). Figure 4(b) shows a clear concentration-dependent reaction when the CD40-Fc protein

was added to OmpC-gp39, in contrast to those wells that were coated with OmpC developed a reaction comparable only to the background of the plates incubated without the CD40-Fc protein ($P < 0.05$).

Two competition assays between CD154 and OmpC-gp39 for binding with CD40 were performed. In the first one, microtitre plates were coated with CD40-Fc, incubated with OmpC-gp39 or OmpC, then with a cocktail of monoclonal antibodies against OmpC, and revealed with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Competition assays were performed by mixing the porins with rhCD154. Figure 3(c) shows that OmpC-gp39 was able to bind CD40-Fc in a concentration dependent manner, whereas OmpC was not, and that rhCD154 competed with OmpC-gp39 for the binding with CD40-Fc, as demonstrated by the decrease in the OD measurements ($P < 0.05$).

The reverse competition assay was performed by coating plates with CD40-Fc, and by incubating with increasing concentrations of rhCD154. Then the plates were treated with a monoclonal antibody against CD154 and with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Competitions were performed mixing the rhCD154 with OmpC or OmpC-gp39. Figure 3(d) shows that the rhCD154 adhered to CD40-Fc in a concentration-dependent manner, and OmpC-gp39 fusion protein was able to completely inhibit this interaction. Interestingly, in this experiment mixing

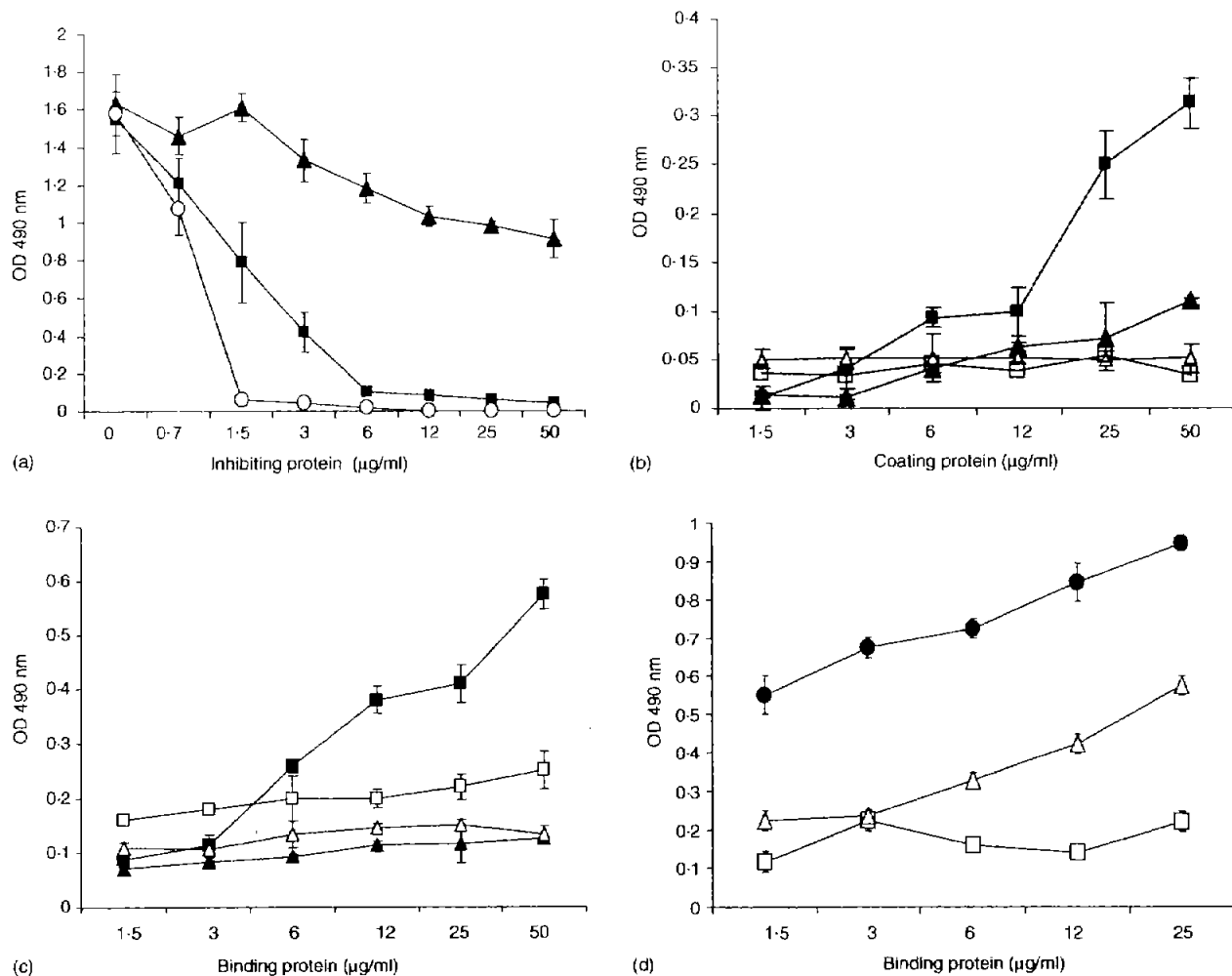


Figure 3. Evaluation of OmpC-gp39 binding to CD40 by ELISA. (a) OmpC-gp39 inhibits CD40 binding to CD154. Plates were coated with CD40-Fc (2 µg/ml), incubated with rhCD154 (5 µg/ml), and with a monoclonal antibody against CD154, and finally developed with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Inhibitions were performed preincubating the CD40-Fc with OmpC (filled triangles), OmpC-gp39 (filled squares) or a monoclonal antibody against CD40 (open circles). (b) OmpC-gp39 binds CD40. Plates were coated with increasing concentrations of OmpC-gp39 (filled squares) or OmpC (filled triangles) (0.4–50 µg/ml), incubated with 2 µg/ml of CD40-Fc and then with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Controls included plates coated with OmpC (open triangles) and OmpC-gp39 (open squares) but without the addition of CD40-Fc. Controls included plates coated with OmpC (open triangles) and OmpC-gp39 (open squares) but without the addition of CD40-Fc. (c) CD154 competes with OmpC-gp39 for the binding with CD40. Microtitre plates were coated with CD40-Fc, incubated with OmpC-gp39 or OmpC (10 µg/ml), then with a cocktail of monoclonal antibodies against OmpC, and then with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Competitions were performed by mixing rhCD154 (5 µg/ml), OmpC-gp39 (filled squares), OmpC-gp39 plus rhCD154 (open squares), OmpC (filled triangles), OmpC plus rhCD154 (open triangles). (d) OmpC-gp39 competes with CD154 for the binding with CD40. Microtitre plates were coated with CD40-Fc, incubated with increasing concentrations of rhCD154, then with a monoclonal antibody against CD154, and with a goat anti-mouse IgG-HRP conjugate. Competitions were performed mixing the rhCD154 with OmpC or OmpC-gp39 (10 µg/ml), rhCD154 (filled circles), rhCD154 plus OmpC-gp39 (open squares), rhCD154 plus OmpC (open triangles). Mean and SD from three independent experiments are presented.

rhCD154 with OmpC decreased the OD by almost 50% suggesting non-specific binding or steric inhibition ($P < 0.05$).

The OmpC-gp39 fusion protein binds human Raji B cell lymphoma cells

The ability of the OmpC-gp39 to bind the Raji B cell line was assessed by flow cytometry. Cells (10^4) were incubated

with increasing concentrations of OmpC or OmpC-gp39, which were previously conjugated to FITC. Figure 4(a) shows a clear concentration response increase of the mean fluorescence intensity with the OmpC-gp39-FITC in comparison with the OmpC-FITC conjugate. Moreover, the fluorescence was inhibited by a monoclonal antibody against CD40 and by unlabelled OmpC-gp39, but not by unlabelled OmpC (not shown) ($P < 0.05$).

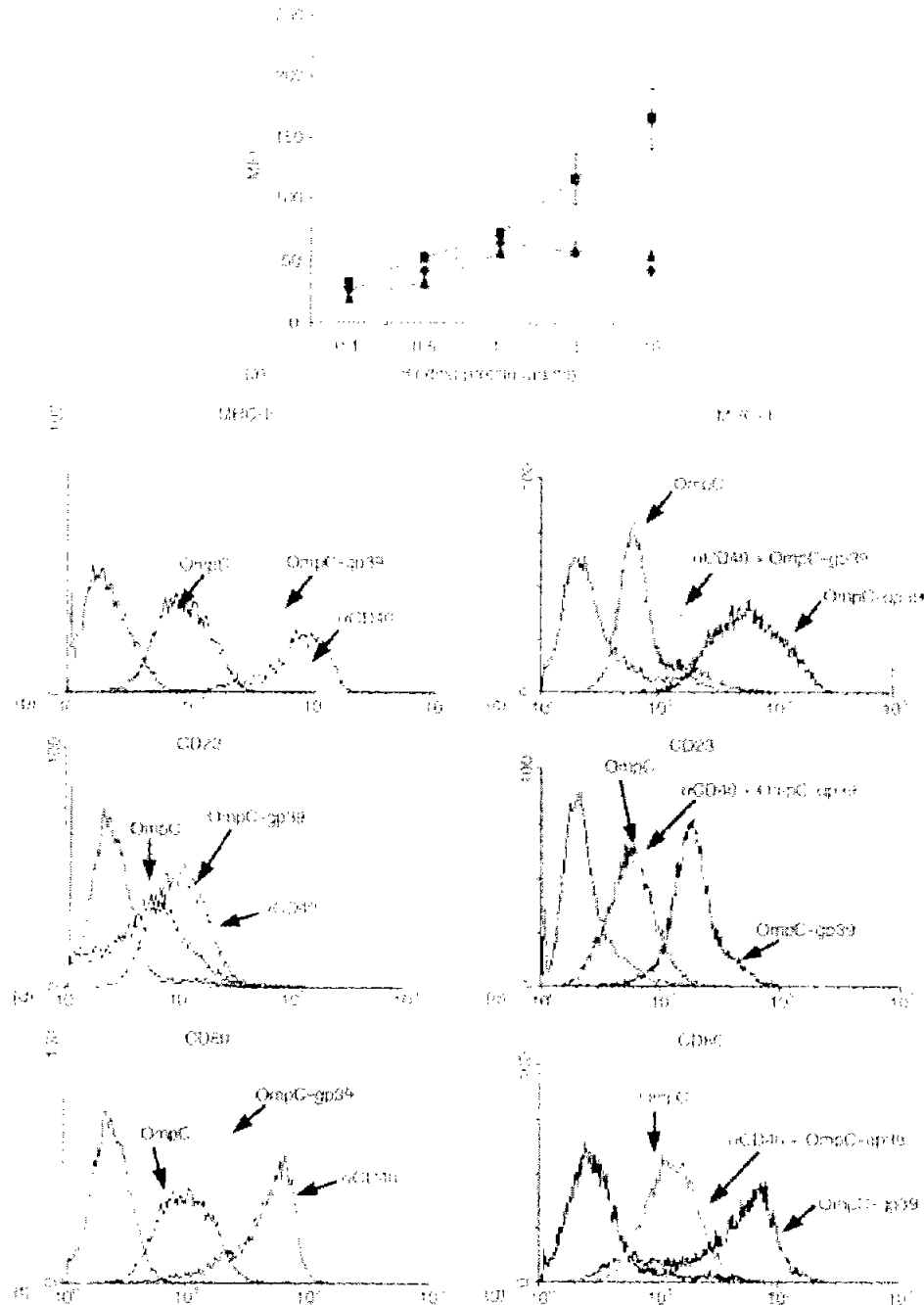


Figure 4. (a) OmpC-gp39 binds Raji B cells. Raji cells were cultured and incubated with OmpC-gp39-FITC or OmpC-FITC conjugates as described in Materials and Methods; 1×10^4 cells were analysed by flow cytometry (5000 events FL1) using the Lysis II software (Ver 1.1). Inhibition assays using an anti-CD40 antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or competitions with unlabelled OmpC or OmpC-gp39 were also performed. OmpC-gp39 (filled squares), OmpC (filled triangles), OmpC-gp39 plus anti-CD40 antibody (filled diamonds), mean and SD from three independent experiments are presented. (b, d, f) OmpC-gp39 activates Raji B cells. The ability of the OmpC-gp39 fusion protein to activate Raji B lymphoma cells determined by the increase of MHC-II, CD23 and CD80 expression, assessed by flow cytometry as described in Materials and Methods. Raji B cells were incubated with purified OmpC-gp39, OmpC (experiments with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ are presented) or with an activating anti-CD40 antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PharMingen) plus IL-4 (100 U/ml). Fluorescence was assessed with anti-MHC-II, CD23 or CD80, conjugated to FITC, in 1×10^4 cells using a flow cytometer (5000 events FL1) and analysed with the Lysis II (Ver 1.1) software. One from five independent experiments is presented. (c, e, g) OmpC-gp39 activity in Raji B cells is inhibited by an anti-CD40 blocking antibody. Raji B cells were cultured as described for (b, d and f), but purified OmpC-gp39 mixed with a blocking anti-CD40 monoclonal antibody for 18 hr in the presence of IL-4 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PharMingen) and then analysed as described. One from five independent experiments is presented.

The OmpC-gp39 fusion protein activates the Raji B-cell lymphoma

The ability of the purified OmpC-gp39 fusion protein to activate Raji cells was evaluated by flow cytometry measuring the induction of MHC-II, CD23 or CD80 expression. Raji cells were cultured with purified OmpC or OmpC-gp39 for 18 hr, then incubated with monoclonal antibodies, FITC conjugates against the surface markers, and the fluorescence was analysed by flow cytometry (Fig. 4(b, d, f) presents results of 50 µg/ml OmpC or OmpC-gp39, which were the optimal experimental conditions). OmpC-gp39 induced MHC-II expression comparable to the monoclonal antibody against CD40 (Fig. 4b), and also induced expression of CD23 and CD80. Although the induction of these molecules was not as high as for CD23, the difference between OmpC-gp39 and OmpC was statistically significant ($P < 0.05$) (Fig. 4d, f). Interestingly, OmpC induced the expression of the three surface molecules investigated, although the mean fluorescence was almost one logarithm smaller as compared with OmpC-gp39. This unexpected observation may be attributed to an intrinsic OmpC biological activity, because Raji cells were not activated by LPS amounts equivalent to those found in the OmpC and OmpC-gp39 preparations (10 and 8 ng/ml, respectively, as determined by the *Limulus polyphemus* coagulation assay) (data not shown). Moreover, the incubation of OmpC-gp39 with a blocking anti-CD40 antibody reduced the expression of MHC-II, CD23 and CD80 suggesting that the OmpC-gp39 biological activity requires interaction with CD40 and is independent of LPS (Fig. 4c, e, g).

DISCUSSION

CD154 is a glycoprotein member of the TNF family that is mainly expressed by activated T lymphocytes. The engagement and signalling through its ligand CD40 is essential for many functions of the immune system, including B- and T-cell maturation and activation, antibody production and isotype switching. At present, there is not a precise model for the CD154/CD40 interaction, but the crystal analysis of the CD154 extracellular fragment demonstrates that it has a trimeric structure, similar to other members of the TNF family. The protein regions involved in CD154/CD40 binding have been predicted using the TNF/TNFR crystallography as a model. It is assumed that the two CD154 main amino acid clusters from two adjacent CD154 monomers are involved in CD40 binding. The critical amino acids in CD154 include K143, Y145, Y146, R203 and Q220, whereas in CD40 they include E74, Y82, D84 N86 and E117. Three CD154 recombinant proteins have been reported which further support the assumption that amino acid residues around the W140-S149 region must be important for CD40 signalling. Those including residues Y45-L261 and E108-L261 are biologically active, whereas one, including residues S149-L261, binds CD40 but is not functional.²⁴

Alignment of CD154 with TNF and leukotriene allowed to identify those amino acid residues at positions 140-149 may be involved in the interaction with CD40. The resulting WAEG-GYYTMS strand was inserted by genetic engineering in the fifth external loop of the outer membrane protein C (OmpC)

from *S. enterica* serovar Typhi, with the idea to obtain a fusion protein capable to bind CD40 and trigger B-cell activation. This protein was selected as carrier of the CD154 amino acid strand, because it has permissive regions where foreign peptides may be inserted without disrupting its tertiary structure. It is known that OmpC, like other porins from Gram negative bacteria, has a barrel-like tertiary structure with an internal pore, loops looking towards the external environment and turns oriented towards the periplasmic space. These permissive sites are located in the external loops, and that porins in solution have the property to aggregate as trimers. OmpC and other porins have been used for the expression of foreign 'passenger' antigens and we have reported that an allergenic peptide fused to the external loop five of OmpC is able to modulate the lung inflammatory response in a mouse model of allergy to ovalbumin.⁴²

The assumption that a fusion protein bearing a small CD154 amino acid strand is able to bind CD40 and induce activation is inconsistent with the model of a trimeric structure as necessary for CD154/CD40 function. Nevertheless, it has been demonstrated that CD154 engages and clusters CD40 in a similar way to other cellular surface receptors, moving through the cell membrane in rafts constituted by detergent insensitive glycosphingolipid rich domains.²⁶ Therefore, the initial trimeric model could be completed by a more dynamic view of the ligand-receptor interaction. This possibility is also consistent by several mini-antibodies with ability to bind CD40 and activate B cells, demonstrating that the interaction of small peptide strands with defined CD40 regions may trigger some biological functions.⁴³

The OmpC-gp39 fusion protein conserved the property to aggregate, as demonstrated by the electrophoretic pattern obtained under non-reducing conditions. Nevertheless, the expression of OmpC-gp39 in the porinless *E. coli* UH302 strain was lower as compared with the native OmpC. This result is consistent with other fusion proteins obtained in our laboratory using a similar approach and may be explained by the use of low efficient codons. However, the fusion protein was purified from the external membrane to assess its biological properties. ELISA competition assays demonstrated that OmpC-gp39 was able to block the binding of a fusion protein to CD40-Fc. Inhibitions were performed by preincubating the rhCD154 with increasing concentrations of OmpC, OmpC-gp39 or an anti-CD40 monoclonal antibody. Only the OmpC-gp39 and the anti-CD40 antibody were able to inhibit the rhCD154/CD40-Fc binding in a concentration-dependent manner (Fig. 3a). Then, a CD40/OmpC-gp39 binding assay was performed by coating plates with OmpC-gp39 or OmpC, incubating with CD40-Fc and then with an anti-IgG conjugate. In this assay a concentration dependent binding of CD40-Fc to OmpC-gp39 was observed (Fig. 3b). Two assays performed with CD40-Fc-coated plates, which were incubated with a mixture of rhCD154 and OmpC-gp39, and then with antibodies against CD154 or OmpC, further confirmed that OmpC-gp39 competes with rhCD154 for the binding to CD40 (Fig. 3c, d). Finally, the flow cytometry experiments performed with OmpC-gp39 conjugated to FITC demonstrated a concentration-dependent binding of the fusion protein to the Raji B-cell line, which was inhibited by the anti-CD40 antibody and by unlabelled OmpC-gp39, but not by unlabelled OmpC (Fig. 4a). All together these observa-

tions support that the OmpC-gp39 fusion protein is able to bind soluble and native CD40 on the surface of the B-cell lymphoma.

The ability of OmpC-gp39 to activate the Raji B-cell lymphoma was evaluated by expression of MHC-II, CD23 and CD80 because the CD154/CD40 interaction is known to up-regulate these molecules in B cells. The fusion protein induced MHC-II expression comparable to the anti-CD40 antibody (Fig. 4b), although less expression of CD23 and CD80 was observed (Fig. 4d, f). The behavior of OmpC was unexpected, because the porin induced background expression of the three surface molecules investigated, although significantly less than the OmpC-gp39 fusion protein. The result was consistent in several independent experiments and could not be attributed to contaminant LPS, because equivalent amounts of *S. minnesota* LPS, which is the most potent mitogen for macrophages and lymphocytes, to those found in the OmpC and OmpC-gp39 preparations failed to activate the B-cell line. Moreover, the biological activity of OmpC-gp39 was decreased by incubating the Raji cells with an anti-CD40 'blocking' antibody, which is not able to activate B cells (Fig. 4c, e, g).

Nevertheless, whether OmpC has an intrinsic biological activity and whether that could have contributed to the OmpC-gp39 function have to be further investigated. This is not a surprising possibility, because several biological activities intrinsic to bacterial Omps have been reported. Hence, OmpA from *Klebsiella pneumoniae* binds to toll-like receptor 2 (TLR2) inducing IL-12 and dendritic cell maturation,⁴⁴ porins from *S. enterica* serovar Typhimurium turn on the activating protein 1 and nuclear factor- κ B through the mitogen-activated protein kinase cascade,⁴⁵ and induce the production of nitric oxide via a protein kinase C-dependent pathway,⁴⁶ and PorB of *Neisseria gonorrhoeae* induces programmed cell death of macrophages.⁴⁷

Interestingly, this fusion protein cultured in the presence of IL-4 failed several attempts to activate B lymphocytes purified from peripheral blood. These results may be explained by inadequate experimental conditions, but also may reflect that OmpC-gp39 may not induce complete B-lymphocyte activation. The results presented here show that this protein binds CD40 and up-regulates CD23, CD80 and MHC-II expression, but the CD154 W140-S149 amino acid strand may be more involved in binding to CD40 than in signalling. On the other hand, it has been suggested that, both the intensity of the CD154/CD40 engagement or the regions committed in the interaction, may influence the degree of B-cell activation. Further experiments, such as antibody switch to IgE isotype or B-cell rescue from apoptosis, are needed to have a more comprehensive idea of the biological activities of OmpC-gp39.

In conclusion, our findings are the first report of a fusion protein bearing a small foreign amino acid strand that is able to bind to its specific receptor and induces activation. This approach could be useful to study ligand-receptor interactions, for vaccine design and for the development of proteins with therapeutic properties.

ACKNOWLEDGMENTS

MVP and SHY were recipients of a fellowship from the IMSS, UNAM and CONACYT. RLP was recipient of a fellowship from the IMSS. This work was in part supported by Grant M28958 from CONACYT

(Mexico) (P.I. CRGB), and Grant 99-693-0014 FOFOL, FP-0038/769 from IMSS (Mexico) (P.I. CRGB). The authors thank BS Blanca Reyes, MS Victor Rosales, and BS Hector Romero for their technical assistance.

REFERENCES

- 1 Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L *et al.* Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 1992; **357**:80-2.
- 2 Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1993; **151**:2497-510.
- 3 Lane P, Trauneker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; **22**:2573-8.
- 4 Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G *et al.* A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 1997; **185**:2053-60.
- 5 Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G *et al.* Thompson J. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 1993; **365**:340-3.
- 6 Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D *et al.* CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol* 1995; **25**:863-5.
- 7 Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995; **378**:617-20.
- 8 Kamanaka M, Yu P, Yasui T *et al.* Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 1996; **4**:275-81.
- 9 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**:111-35.
- 10 Armitage RJ, Maliszewski CR, Alderson MR, Grabstein KH, Spriggs MK, Fanslow WC. CD40L: a multi-functional ligand. *Semin Immunol* 1993; **5**:401-12.
- 11 Hollenbaugh D, Ochs HD, Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. The role of CD40 and its ligand in the regulation of the immune response. *Immunol Rev* 1994; **138**:23-37.
- 12 Allen RC, Armitage RJ, Conley ME *et al.* CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993; **259**:990-3.
- 13 Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D *et al.* The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993; **72**:291-300.
- 14 DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint BG. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; **361**:541-3.
- 15 Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 1993; **14**:559-64.
- 16 Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* 1994; **180**:157-63.
- 17 Grewal IS, Flavell RA. The CD40 ligand. At the center of the immune universe? *Immunol Res* 1997; **16**:59-70.
- 18 Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D. 2A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure* 1995; **3**:1031-9.
- 19 Bajorath J, Chalupny NJ, Marken JS *et al.* Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry* 1995; **34**:1833-44.
- 20 Banner DW, D'Arcy A, Janes W *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993; **73**:431-45.

- 21 Bajorath J, Aruffo A. Construction and analysis of a detailed three-dimensional model of the ligand binding domain of the human B cell receptor CD40. *Proteins* 1997; **27**:59–70.
- 22 Bajorath J, Marken JS, Chalupny NJ *et al.* Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 1995; **34**:9884–92.
- 23 Durandy A, Schiff C, Bonnefoy JY *et al.* Induction by anti-CD40 antibody of soluble CD40 ligand and cytokines of IgG, IgA and IgE production by B cells from patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Eur J Immunol* 1993; **23**:2294–9.
- 24 Mazzei GI, Edgerton MD, Losberger C *et al.* Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 1995; **270**:7025–8.
- 25 Hsu YM, Lucci J, Su L, Ehrenfels B, Garber E, Thomas D. Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**:911–5.
- 26 Grassme H, Bock J, Kun J, Gulbins E. Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem* 2002; **277**:30289–99.
- 27 Ferrant JL, Wilson CA, Benjamin CD *et al.* Variation in the ordered structure of complexes between CD154 and anti-CD154 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2002; **39**:77–84.
- 28 Puente JL, Juarez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E. The *Salmonella* ompC gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* 1995; **156**:1–9.
- 29 Skurray RA, Hancock RE, Reeves P. Con- mutants: class of mutants in *Escherichia coli* K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage. *J Bacteriol* 1974; **119**:726–35.
- 30 Cole ST, Sonntag I, Henning U. Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 1982; **149**:145–50.
- 31 Blanco LP, Toro CS, Romero JM, Santiviago CA, Mora GC. *Salmonella typhi* Ty2 OmpC porin induces bactericidal activity on U937 Monocytes. *Microbiol Immunol* 1997; **41**:999–1003.
- 32 Aguero J, Mora G, Mroczewski-Wildy MJ, Fernandez-Beros ME, Aron L, Cabello FC. Cloning, expression and characterization of the 36 kDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 1987; **3**:399–407.
- 33 Paniagua J, Martin N, Ortiz V, Ramirez G, Gonzalez CR, Isibasi A. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* OmpC porin are exposed on the bacterial surface. *Immunol Infect Dis* 1995; **5**:244–9.
- 34 Arockiasamy A, Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. *Anal Biochem* 2000; **283**:64–70.
- 35 Erdei J, Forsgren A, Naidu AS. Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994; **62**:1236–40.
- 36 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248–54.
- 37 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**:680–5.
- 38 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**:4350–4.
- 39 Epstein MA, Achong BG, Barr YM, Zajac B, Henle G, Henle W. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J Natl Cancer Inst* 1966; **37**:547–59.
- 40 Goding JW. Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. *J Immunol Methods* 1976; **13**:215–26.
- 41 Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 1993; **177**:925–35.
- 42 Yopez SH, Pando RH, Argumedo LS *et al.* Therapeutic efficacy of an *E. coli* strain carrying and ovalbumin allergenic peptide as a fused protein to OmpC in a murine model of allergic airway inflammation. *Vaccine* 2003; **21**:566–78.
- 43 Ellmark P, Ottosson C, Borrebaeck CA, Malmborg Hager AC, Furebring C. Modulation of the CD40–CD40 ligand interaction using human anti-CD40 single-chain antibody fragments obtained from the n-CoDeR phage display library. *Immunology* 2002; **106**:456–63.
- 44 Jeannin P, Renno T, Goetsch L *et al.* OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* 2000; **1**:502–9.
- 45 Galdiero M, Vitiello M, Sanzari E, D'Isanto M, Tortora A, Longanella A, Galdiero S. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activate the transcription factors activating protein 1 and NF-kappaB through the Raf-1-mitogen-activated protein kinase cascade. *Infect Immun* 2002; **70**:558–68.
- 46 Gupta S, Kumar D, Vohra H, Ganguly NK. Involvement of signal transduction pathways in *Salmonella typhimurium* porin activated gut macrophages. *Mol Cell Biochem* 1999; **194**:235–43.
- 47 Muller A, Gunther D, Dux F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J* 1999; **18**:339–52.