



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Evaluación de la expresión de la porina OmpC en un sistema heterólogo de expresión *in vitro* e *in vivo*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LF. Gonzalo González Domínguez

Director de Tesis

Dr. Constantino III Roberto López Macías

Unidad en Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ)-CMN SIGLO XXI

Comité Tutorial

Dra. Gladis Fragoso González

Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB)-UNAM

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

Instituto de Biotecnología (IBT) -UNAM

Ciudad de México. Mayo 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I. RESUMEN	3
II. MARCO TEÓRICO	4
A. Enfermedades causadas por <i>Salmonella enterica</i>	4
B. Vacunas contra <i>Salmonella</i>	4
C. Desarrollo de una propuesta vacunal contra <i>Salmonella enterica</i> a base de proteínas de membrana externa	5
D. Posible contribución del LPS en la inmunogenicidad de las porinas	7
E. Vacunas de DNA	7
F. Vacunas de DNA contra <i>Salmonella</i>	8
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	10
V. HIPÓTESIS	10
VI. OBJETIVO GENERAL	10
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	10
VIII. Materiales y Métodos	10
IX. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	19
X. RESULTADOS	19
XI. DISCUSIÓN	32
XII. PERSPECTIVAS	35
XIII. REFERENCIAS	35

I. RESUMEN

Estudios en nuestro grupo de trabajo han demostrado que las porinas purificadas de *S. Typhi* son candidatos vacunales con el potencial de proteger contra la infección causada por dicho patógeno. Estas proteínas de membrana externa, las cuales son purificadas directamente de la bacteria, pudieran contener una fracción remanente de lipopolisacárido (LPS) no detectada por los métodos analíticos. Con el objetivo de contar con una herramienta que nos permita estudiar la respuesta inmune a las porinas en ausencia de LPS, se evaluó la capacidad de diferentes construcciones para expresar la porina OmpC de *S. Typhi* de manera heteróloga en células de mamífero. Construcciones nativas (Wt) y mutantes (Mut, cambio de asparagina por glutamina) fusionadas a la secuencia señal TPA fueron evaluadas, además de probar algunas sin el péptido líder de la porina. Como primer paso, se determinó la integridad de los plásmidos, la cual fue evaluada a través de ensayos de restricción, PCR y secuenciación de Sanger. Los resultados demostraron que los plásmidos estaban íntegros, con el inserto sin modificaciones en la secuencia. Posteriormente, se evaluó la expresión de la porina OmpC *in vitro* en células HEK 293 FT, donde se observó que las porinas se encontraban principalmente en el compartimento intracelular, en forma de monómero, y una pequeña proporción se encontró en el medio de cultivo en forma de dímero. Las proteínas con secuencia nativa se expresaron con pesos moleculares mayores a las proteínas con secuencia mutante, lo cual sugiere que hay alguna modificación postraducciona, como puede ser la glicosilación. Finalmente, se evaluó la expresión *in vivo* a través de la inoculación subcutánea de los plásmidos en un modelo de ratón. Seguido a la inoculación, se observó que el plásmido se mantiene en el sitio de inyección hasta por 14 días, y es transportado al ganglio entre las primeras 24-48 horas post inoculación. Además, la proteína se expresa en el sitio en el cual es inyectada. Con base a estos resultados, pudimos concluir que estos plásmidos expresan la proteína, tanto *in vitro* como *in vivo*, y pudieran ser empleados para evaluar la respuesta inmune a OmpC en ausencia de LPS.

II. MARCO TEÓRICO

G. Enfermedades causadas por *Salmonella enterica*

Salmonella enterica es el agente causal de las Fiebres Entéricas y la Salmonelosis No Tifoídica (SNT). En particular, la serovariedad Typhi es la responsable de la fiebre tifoidea. Por otro lado, existen las serovariedades Paratyphi A, B y C causantes de la fiebre paratifoidea, y otras más causantes de SNT, entre las que se destacan *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Las enfermedades causadas por *Salmonella enterica* son más frecuentes en países en vías de desarrollo, mientras que en países desarrollados esta enfermedad se asocia con viajeros que visitan lugares endémicos a la enfermedad a nivel mundial. Las poblaciones más susceptibles son niños menores de 5 años y adultos de la tercera edad. A nivel global, se estima que cada año ocurren alrededor de 14.3 millones de casos de fiebre entérica, causando 135 mil muertes (Browne A.J. et al, 2020). Así mismo, se reportan alrededor de 93.8 millones de casos por SNT, con 135 mil muertes (Yefang K. et al, 2020). En personas inmunocomprometidas, los casos de SNT se pueden complicar a una infección invasiva (iSNT). En 2018 se reportaron 3.4 millones de casos, causando 681 mil muertes (Balasubramanian R. et al, 2018). Para octubre del 2021, en México se reportaron 15,217 casos de fiebre tifoidea y 4,910 casos de fiebre paratifoidea (SINAVE/DGE/Salud 2021).

H. Vacunas contra *Salmonella*

La infección por *Salmonella* se puede prevenir aplicando las medidas de higiene y control de alimentos y agua para el consumo, así como estableciendo condiciones apropiadas para el manejo y tratamiento de desechos y aguas residuales. Por otro lado, la resistencia a antibióticos por parte de la bacteria sigue siendo un problema que, desafortunadamente, limita el uso de medicamentos potentes como Ceftriaxona y Ciprofloxacino para tratar la enfermedad (Nair et al, 2018). Debido a esto, la vacunación sigue siendo una alternativa importante para la prevención de estas patologías.

Actualmente, las vacunas comerciales contra *S. Typhi* han mostrado ser moderadamente eficaces; la vacuna oral atenuada Ty21a, por ejemplo, confiere entre 33-96% de protección después de 3-4 dosis y sólo durante 5-7 años, administrándose a partir de dos años. La vacuna basada en el polisacárido Vi

induce una protección del 64-72% por 17-21 meses y del 55% por 3 años después de una sola dosis. Sin embargo, Vi es un antígeno poco inmunogénico en niños menores de 2 años (Sinha A. et al, 1999), además, se ha reportado un aumento en el número de cepas Vi-negativas (Crump, L. et al, 2004).

Entre las vacunas desarrolladas recientemente contra la fiebre tifoidea se encuentra Typbar-TCV®, la primera vacuna conjugada precalificada por la Organización Mundial de la Salud, esta vacuna está compuesta por un antígeno polisacárido (antígeno Vi) conjugada con el toxoide tetánico. La precalificación implica que la vacuna cumple con los estándares de calidad, seguridad y eficacia, por lo que es elegible para la adquisición por las agencias de las Naciones Unidas, como el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Además, puede ser administrada a niños desde los seis meses de edad, a diferencia de otras que se administran a mayores de dos años, y a adultos (WHO, 2018).

Actualmente no existen vacunas contra la SNT, las iSNT siguen siendo un reto en el campo de las vacunas. Se ha trabajado en el desarrollo de vacunas empleando bacterias inactivadas (Hashizume-Takizawa T. et al, 2015), bacterias vivas atenuadas (Tennant S.M. et al, 2015), y carbohidratos (antígeno O del LPS) (Svenson S.B. et al, 1981), Flagelina (Kodama C. et al, 2004; Bobat S. et al, 2011), y otras, aunque muchos de ellos no logran pasar las fases clínicas, por lo tanto, no hay ninguna en el mercado actualmente.

I. Desarrollo de una propuesta vacunal contra *Salmonella enterica* a base de proteínas de membrana externa.

Algunos grupos de investigación han estudiado antígenos a base de carbohidratos para la generación de una posible vacuna contra la fiebre tifoidea, estos expresados en bacterias y usándolas como vectores (K. Xiong et al, 2017; P. Li et al, 2018). Incluso se ha desarrollado como alternativa la conjugación de estos con toxoides de otras bacterias (P. Van Damme et al, 2011; V.D. Thiem et al, 2011; Shakya M. et al, 2019), algunos ya en etapas clínicas. Sin embargo, hay pocos estudios en los cuales se empleen proteínas como inmunógenos (ej. SseB/flagelina) (Lee S. et al, 2017).

En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) se identificó que unas proteínas de membrana externa, las porinas OmpC (figura 1) y OmpF, son el blanco de la respuesta inmune contra la *S. Typhi* en pacientes con fiebre tifoidea en estado agudo y convaleciente. La inmunización con las proteínas purificadas confiere 90% de protección contra el reto de hasta 500 DL50 de *S. Typhi* en un modelo de ratón (Isibasi A. et al, 1992). También se demostró que estas proteínas son el blanco no sólo de los anticuerpos, sino también de linfocitos T (Blanco F. et al, 1993; Vega M.I. et al, 2003). Además, se ha encontrado que las porinas OmpS1, OmpS2, OmpC y OmpF, son potentes inmunógenos con propiedades adyuvantes que inducen una respuesta de anticuerpos con capacidad bactericida (Secundino I. et al, 2006; Moreno-Eutimio M.A. et al, 2013; Pérez-Toledo M. et al, 2017).

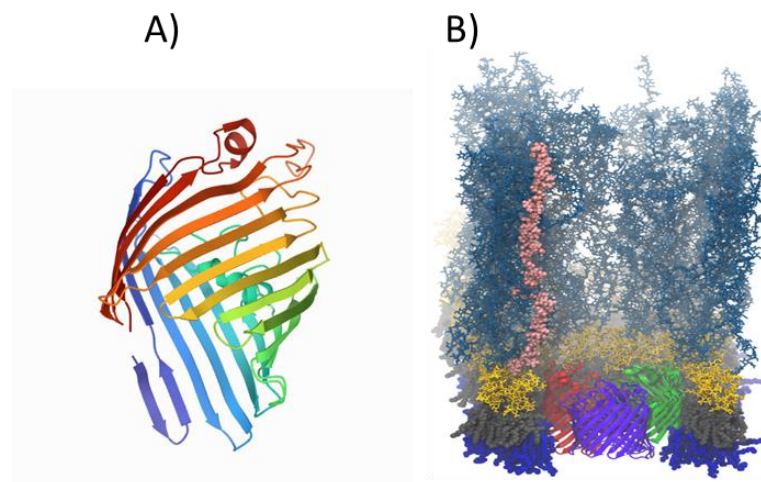


Figura 1.- Modelo de la porina OmpC de S. Typhi. A) Estructura monomérica y B) trimérica (rojo, morado y verde) de la porina OmpC. Las porinas se expresan en forma de barriles beta y se organizan en forma de trímeros en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, las cuales están rodeadas por moléculas de lipopolisacárido.

Con base en lo anterior, en la unidad se diseñó y fabricó una vacuna hecha a base de porinas de *S. Typhi*, a la que se le denominó ISIPOR. Esta vacuna fue evaluada en un estudio clínico fase I, administrando 10 µg de porinas purificadas en 11 voluntarios sanos. Se demostró que esta vacuna fue segura, bien tolerada, y capaz de inducir una respuesta inmune específica mediada por anticuerpos IgG e IgM y linfocitos T específica contra la porina secretores de IFN-γ (Salazar-González R.M. et al, 2004). La presencia de anticuerpos IgG específicos contra

las porinas en los voluntarios vacunados fue detectable hasta once años después (Pérez-Shibayama C. et al, 2014) de su aplicación.

J. Posible contribución del LPS en la inmunogenicidad de las porinas

El LPS es un glicolípido estructural que se encuentra enriquecido en las membranas de las bacterias Gram negativas y puede ser reconocido por TLR-4 (Tang D. et al, 2012). Las porinas son extraídas y purificadas a partir de cultivos de *Salmonella* por lo que la presencia de LPS es evaluada en cada lote producido, el límite de detección es de 0.02 ng LPS/μg de proteína; por lo tanto, cantidades inferiores no son detectables y no es posible descartar por completo su presencia. A pesar de que se ha descartado la contribución del LPS en la inmunogenicidad y capacidad protectora de las porinas a través de utilizar controles en donde las porinas digeridas con proteinasa K pierden su inmunogenicidad y capacidad protectora ya que la proteína es escindida mientras que el LPS se mantiene intacto. A pesar de esto, el LPS podría contribuir de otras formas en la inmunogenicidad de las porinas, ayudando a estabilizar al trímero o generando algún epitopo compartido entre la porina y el LPS. Con el fin de estudiar la inmunogenicidad de las porinas en ausencia de LPS, es necesario producirlas en sistemas ausentes de LPS. Una forma de poder llevar esto a cabo, es emplear un sistema heterólogo de expresión en células eucariontes para la producción y purificación de las porinas recombinantes ya que en estos sistemas no se encuentra presente el LPS. Adicionalmente se pueden utilizar plásmidos que cuenten con los elementos necesarios para expresar la proteína en el tejido animal a las que se les ha denominado vacunas de DNA.

K. Vacunas de DNA

En los años 60's se observó que la inoculación de DNA que codifica para diferentes antígenos tumorales inducía una respuesta inmune en ratones contra el polioma virus. (Orth G. et al, 1964). La inmunización con vacunas de DNA induce respuesta de anticuerpos y de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas (Wang B. et al, 1993; Fynan E.F. et al, 1993; Ulmer J.B. et al, 1993). Hasta el momento, no existen vacunas de DNA aprobadas para uso humano, solo se cuenta con

tres vacunas de DNA autorizadas para uso veterinario (Davis et al, 2001; Garver et al, 2005; Grosenbaugh et al, 2011; Denies et al, 2012): Virus del Nilo Occidental (caballos), necrosis hematopoyética infecciosa (salmones) y melanoma canino (perros). Sin embargo, dadas las condiciones de la pandemia actual, existe una vacuna de DNA, INO-4800, la cual ha dado resultados prometedores (Mammen P. et al, 2021). Actualmente la farmacéutica INOVO se encuentra en el desarrollo del protocolo para el estudio de fase 3 de su vacuna de DNA, la cual se probará un régimen de dos dosis, 2 mg/ dosis (Inovio.org). Previamente, ellos ya demostraron que la vacuna induce títulos neutralizantes contra diferentes variantes del SARS-Cov-2 (Andrade V. et al, 2021).

Las vacunas de DNA son capaces de inducir respuesta inmune innata y adaptativa a través de dos vías: 1) Los antígenos (proteínas o polipéptidos) codificados por el DNA plasmídico pueden expresarse en las células del tejido (p ej. células musculares) así como en células dendríticas (DC's), donde estos antígenos son procesados y presentados a células T CD4+ o CD8+ por presentación directa o presentación cruzada respectivamente y 2) DNA plasmídico transfectado por sí mismo puede unirse a un sensor de DNA citosólico no identificado y activar la vía TBK1-Sting y la producción de interferones (IFN's) tipo I los cuales funcionan como adyuvante (Cevayir C. et al, 2013).

Además de la estrategia inmunológica que representan las vacunas de DNA, esta metodología posee otras ventajas atractivas para explotarla e incorporarla como una plataforma para el diseño de nuevas vacunas. Las vacunas de DNA no contienen formas vivas ni replicantes de patógenos lo que evita que reviertan a su forma virulenta. Su diseño permite codificar múltiples antígenos dentro de un sólo plásmido, esto produce un abanico más amplio en la respuesta inmune y una mejor protección, ya que se ha demostrado que diferentes epítomos dentro de un solo patógeno desencadenan diferentes tipos de respuesta inmune.

L. Vacunas de DNA contra *Salmonella*

Estudios previos realizados con dos vacunas de DNA que tienen el gen para la proteína OmpC, en la cual a una de ellas se le removió la secuencia del péptido

líder de la porina, se observó que aquella construcción que conserva la secuencia completa de la porina induce una respuesta de anticuerpos IgG contra esta proteína, a diferencia de la vacuna donde se removió el péptido señal (López Macías C. et al, 2005).

La adición de secuencias señal como el Activador del Plasminógeno Tisular (TPA) a la secuencia de interés, y la edición de péptidos líder, tienen como objetivo modular el tipo de respuesta generada debido a la direccionalidad que se le da al antígeno una vez que éste es expresado (Delogu G. et al, 2002; Hermann J. 2006). El TPA favorece la secreción del antígeno al medio extracelular, la edición de péptidos líder puede dirigir al antígeno tanto al medio intracelular, extracelular, así como a las membranas, modulando así el tipo de respuesta inmune (humoral o celular) (Koprowski H. & Weiner D, 1998). Con base en esto, nuestro grupo de investigación ha realizado la construcción de secuencias modificadas de la porina OmpC, a las cuales se les adicionaron las moléculas mencionadas (TPA), así como deleciones (péptido líder) y mutaciones para eliminar sitios de glicosilación (Asn→Gln) a lo largo de la secuencia. Esto último es muy importante dado que los carbohidratos pueden enmascarar o generar epítomos nuevos.

Con estas construcciones se pretende evaluar la expresión de la porina OmpC y posteriormente la inducción de la respuesta inmune tanto humoral como celular en la cual se evaluará la capacidad inmunogénica libre de LPS.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las porinas de *S. Typhi* tienen la capacidad de generar inmunidad contra el reto con la bacteria homóloga. La extracción y purificación de estas proteínas a partir de cultivos de *Salmonella* conlleva a la presencia de LPS que podría contribuir de diversas formas a la inmunogenicidad de las porinas. Es por tanto importante generar sistemas de expresión de porinas libres de LPS que permitan estudiar los mecanismos de inducción de inmunidad generados únicamente por la proteína. Para esto, diseñamos unas vacunas de DNA que contienen el gen de la porina OmpC, sin embargo, es necesario confirmar que es posible expresar el antígeno en un sistema heterólogo de expresión, por lo que en este trabajo evaluamos la expresión en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La porina OmpC se podrá expresar de manera recombinante en un sistema heterólogo de expresión en células de mamífero?

V. HIPÓTESIS

La porina OmpC recombinante se produce de forma eficiente en un sistema heterólogo de expresión de mamífero.

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de las diferentes construcciones que contienen el gen de la porina OmpC en modelos *in vitro* en células de mamífero e *in vivo*.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Amplificar y purificar los diferentes plásmidos que contengan el gen de OmpC
2. Evaluar la expresión de la porina OmpC en la línea celular HEK 293FT.
3. Evaluar la distribución del plásmido y la expresión de la porina OmpC en un modelo de ratón.

VIII. Materiales y Métodos

Plásmidos

Cada plásmido tiene un origen de replicación PUC, un gen de resistencia a kanamicina, un promotor de citomegalovirus (CMV) y la secuencia del transgén con diferentes variantes. Algunas secuencias tienen adicionado la secuencia señal TPA (Figura 2).

Secuencia OmpC nativa o Wildtype (Wt): secuencia del gen OmpC con optimización de codones para su expresión en mamíferos. Al traducirse, se genera la porina OmpC en su conformación nativa, incluidos los sitios de posible glicosilación.

Secuencia OmpC mutante (Mut): secuencia del gen OmpC con optimización de codones para su expresión en mamíferos con mutaciones en los sitios de glicosilación, de los cuales, 6 se encuentran en las posiciones de hojas beta, y uno en las asas externas. Al traducirse esta no tendrá los sitios de glicosilación.

Secuencias TPA-OmpC Wt y Mut: son secuencias a las cuales se les fueron añadidas la secuencia señal TPA. Por otro lado, las secuencias TPA-OmpC Wt y Mut Δ L son construcciones cuya secuencia que codifica para el péptido líder bacteriano fue removida, además, conserva la secuencia señal TPA. Finalmente, los plásmidos OmpC Wt y Mut son construcciones que no tienen la secuencia señal TPA, pero sí el gen completo de la porina OmpC.

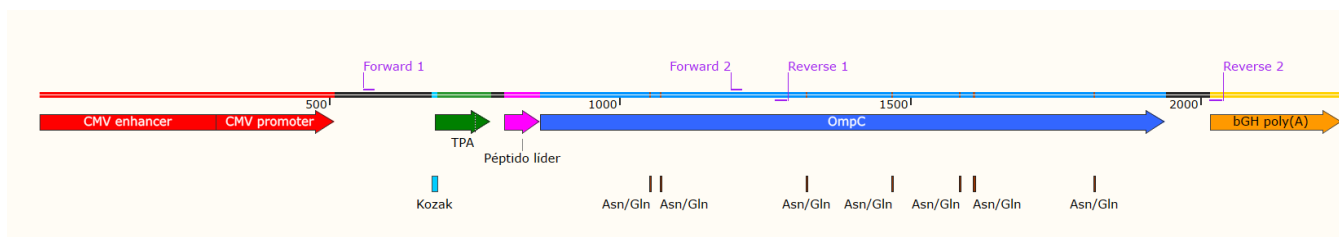


Figura 2.- Imagen representativa de las construcciones diseñadas para evaluar la expresión de la porina OmpC. La secuencia está bajo el promotor de Citomegalovirus (rojo) y tiene una secuencia terminadora de poliadenilación (naranja). En verde se indica la secuencia señal TPA y en magenta el péptido líder de la porina OmpC (azul rey). Las regiones en café representan las posiciones en las cuales se llevó a cabo la mutación de los aminoácidos. Finalmente, se incluyen las zonas flanqueadas por los oligos empleados para la amplificación de los productos de PCR y secuenciación capilar (morado).

Como controles se tienen las siguientes construcciones: pMono FLiC, el cual es un vector el cual tiene insertado el gen de la flagelina en lugar de la secuencia OmpC. El vector vacío, el cual es un plásmido sin inserto, y por último, el plásmido pEGFP, el cual codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP).

Generación de banco de bacterias competentes

Un vial de bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH5 α de la marca comercial Thermo Fisher Scientific (18265017) se adicionó a 10 mL de medio Luria Bertani (LB) en un tubo de 50 mL. Las bacterias se incubaron toda la noche (14-16 horas) a 37°C, con agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). Al día siguiente, se tomaron 10 μ L del cultivo y se pasaron a un matraz con 100 mL de medio LB. Las bacterias se incubaron a 37°C, con 200 rpm hasta alcanzar una O.D.₆₀₀: 1.0. Las bacterias se centrifugaron para descartar el sobrenadante y posteriormente se resuspendieron en 100 mL de medio LB con glicerol al 20%. Se tomo 1 ml del cultivo para generar el banco maestro y el banco de trabajo, con 50 viales de bacterias DH5 α cada uno. Las bacterias se almacenaron a -80°C.

A partir de un vial de bacterias congeladas, se sembraron 5 μ L en 5 mL de medio LB en un tubo de 50 mL. Las bacterias se incubaron toda la noche (14-16 horas) a 37°C, con agitación de 200 rpm. Al día siguiente, se tomó una muestra del cultivo con una pipeta de 10 μ L y se sembró en un tubo de 50 mL con 5mL de medio LB. Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm) por aproximadamente 4 horas hasta alcanzar una O.D.₆₀₀: 0.4.

Una vez alcanzada la O.D.₆₀₀: 0.4, las bacterias se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ 0.1M frío, incubando en hielo por 30 minutos. Las bacterias se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ 0.1 M con glicerol al 15%.

La mezcla de bacterias competentes se separó en tubos de 0.6 mL con 100 μ L de la mezcla transformante y se almacenaron a -80°C.

Transformación por choque térmico

A partir de un vial de bacterias competentes congeladas, se dejaron descongelar en hielo y posteriormente se adicionaron 5 μ L de cada plásmido, sin resuspender la mezcla. Las bacterias se dejaron incubar por 30 minutos en hielo, y posteriormente se sometieron al choque térmico: 30 segundos en baño maría a 42°C, e inmediatamente pasar al hielo. Pasando 5 minutos en el hielo, se adicionaron 200 μ L de medio LB, se incubaron por 1 hora a 37°C, con agitación de 200 rpm.

Posteriormente, se tomaron entre 50-100 μ L de cada tubo y las transformantes se sembraron en placas con agar LB-Kanamicina (100 μ g/mL). Las placas se invirtieron y se incubaron por 14 horas a 37°C.

Diseño de oligonucleótidos para PCR y secuenciación capilar

Con el fin de verificar la presencia del inserto, así como determinar su secuencia exacta, se diseñaron 2 pares de oligos: un par que flanqueara la parte externa al gen de la porina OmpC, así como un par con secuencias complementarias al interior del gen.

En la siguiente tabla se presentan las secuencias, temperaturas de alineamiento y número de pares de bases:

Tabla 1.- Oligos empleados para PCR y secuenciación capilar de las vacunas de DNA.

Oligo	Secuencia	Tm (°C)	Pares de bases
Forward 1	5' CGA CGA GCT CGT TTA GTG AAC CG 3'	59.70	23
Reverse 1	5' ATC CAC CAG GCC GAA GAA ATC G 3'	59.60	22
Forward 2	5' TT CGG CGG CGA TAC CTA CG 3'	60.50	20
Reverse 2	5' GCT GGC AAC TAG AAG GCA CAG TCG 3'	62.00	24

PCR de colonia

A partir de la selección de una colonia crecida en las placas de las bacterias transformadas, se emplearon las siguientes condiciones para la verificación de la presencia del inserto:

Reacción de PCR (25 µL):

Buffer 10x: 2.5 µL (1x), dNTPs 2 mM: 2.5 µL (0.2 mM), MgCl₂ 50 mM: 0.8 µL (1.6 mM), Oligo Fwd 10 mM: 0.6 µL (0.24 mM), Oligo Rev 10 mM: 0.6 µL (0.24 mM), Taq platinum 5U/µL: 0.2 µL (0.04), Agua libre de nucleasas necesaria para completar 25 µL.

- Desnaturalización inicial: 95°C, 5 minutos.
- Fase cíclica (30 ciclos):

Desnaturalización: 95°C, 40s

Fusión: 57°C, 40s

Extensión: 72°C, 95s

- Extensión final: 72°C, 7 min

Una sola colonia se extrajo con una punta estéril de 20 µL y se depositó en la reacción de PCR.

Purificación de DNA plasmídico por Miniprep

A partir de las colonias aislada, estas se sembraron en 5 mL de medio LB para el cultivo. Las bacterias se incubaron toda la noche (14-16 horas) a 37°C, con agitación de 200 rpm. Al día siguiente, se realizó la purificación de los plásmidos siguiendo las instrucciones del Kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Los plásmidos purificados se cuantificaron y se determinó su pureza por Nanodrop.

Purificación de DNA plasmídico por Midiprep

A partir de 10 µL del cultivo remanente para el Miniprep, se inocularon 50 mL de medio LB para el cultivo. Las bacterias se incubaron toda la noche (14-16 horas) a 37°C, con agitación de 200 rpm. Al día siguiente, se realizó la purificación de los plásmidos siguiendo las instrucciones del Kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep (Invitrogen). El plásmido purificado se cuantificó y se determinó su pureza en una relación 260/280 nm.

PCR de DNA plasmídico

Se emplearon las mismas condiciones que la PCR de colonia, usando 25 ng de DNA plasmídico.

Ensayos de Restricción

Para verificar la identidad del plásmido se llevó a cabo un análisis de restricción. Para linealizar el plásmido, se realizó una digestión sencilla con la enzima Anza Acc 65I, mientras que *para liberar el inserto se realizó una digestión doble con las enzimas Anza Not I y Anza Hind III:*

Digestión sencilla: Buffer Anza 10x, 2 µL; Enzima Anza Acc65 I, 1 µL; DNA, 500 ng; Agua libre de nucleasas: cuanto baste para (cbp) 20 µL.

Digestión doble: Buffer Anza 10x, 2 µL; Enzima Not I, 1 µL; Enzima Hind III, 1 µL; DNA, 500 ng; Agua libre de nucleasas: cbp 20 µL

La digestión de llevó a cabo por 15 minutos, a 37°C. posteriormente, la inactivación de la(s) enzima(s) se llevó a cabo a 80°C por 20 minutos.

Electroforesis de ADN

Se prepararon geles de agarosa al 0.75 % (para plásmidos) o al 1% (para

productos de PCR) en TAE y Bromuro de Etidio (0.5g/L). La electroforesis se llevó a cabo a 100 Volts durante una hora. Al finalizar, los geles se revelaron en un transiluminador con luz Ultravioleta.

Secuenciación Capilar

Para verificar la secuencia de los plásmidos, se llevó a cabo una secuenciación capilar de cada uno de los plásmidos en el Laboratorio de Secuenciación de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, empleando los 4 oligos mencionados en la Tabla 1.

Una vez obtenidas cada una de las secuencias individuales, se realizó un alineamiento de ellas con la secuencia original para descartar mutaciones puntuales.

Generación de suero hiper-inmune anti-OmpC

Ratones BALB/c machos de 6-8 semanas fueron inmunizados con 10 µg de porina OmpC vía intraperitoneal semanalmente por un total de 6 semanas. A la séptima semana se sangraron los ratones y se colectó la sangre en tubos (Microtainer). El suero se separó centrifugando los tubos a 4000 rpm por 10 minutos y se almacenó a -20°C.

Citometría de flujo

A células transfectadas con 1, 2.5 y 5 µg de plásmido pEGFP, se les retiró el sobrenadante y se colectaron en un tubo de citometría. A cada uno de los diferentes tubos se les adicionó PFA al 4% frío para su fijación durante 15 minutos. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS y posteriormente fueron incubadas con el colorante DAPI por 15 minutos para resaltar los núcleos. Las células se lavaron 2 veces con PBS y fueron analizadas en un citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) en el Laboratorio de Citometría del Centro de Instrumentos de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS. La eficiencia de transfección se determinó a partir de las células viables (DAPI negativas) positivas para GFP.

Transfección de células HEK 293 FT

1x10⁶ células HEK 293 (R7007) fueron cultivadas en cajas de cultivo T25 con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, hasta alcanzar la confluencia del 70%. A partir de ese cultivo, se sembraron 1x10⁶ células en placas de 6 pozos y se cultivaron a 37°C con CO₂ al 5%, hasta alcanzar una confluencia del 70-90%. Una vez alcanzada la confluencia necesaria, se retiró el medio DMEM y se añadieron 1.5 mL de medio Opti-MEM en cada pozo.

Se prepararon los complejos de plásmido-lipofectamina 3000 (Invitrogen) mezclando 1µg de un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente, pEGFP (control), y 2.5 µg de cada una de las 6 construcciones con 7.5 µL de lipofectamina 3000 y 10 µL de reactivo p3000 disueltos en medio Opti-MEM, de acuerdo con las indicaciones del kit. Las células fueron transfectadas con la mezcla y se incubaron a 37°C y con CO₂ al 5%. A las 16 horas post transfección, se suplementó el medio con DMEM-SFB para alcanzar una concentración final de SFB al 10%. Al cabo de 48 horas post transfección, se recuperaron las células y el sobrenadante para los análisis bioquímicos.

Electroforesis y Western Blot

A las 48 horas post-transfección, se colectaron las células y el sobrenadante (medio de cultivo). Las células se resuspendieron en 200 µL de buffer RIPA (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1.0% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) Deoxicolato de Sodio, 1.0 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS y 0.01% (w/v) azida de sodio a pH of 7.4, suplementado con el coctel de inhibidores de proteasas (halt protease inhibitor cocktail 100x, ThermoFisher) y se lisaron con en agitación con vortex cada 15 minutos, en un tiempo total de una hora. Posterior a la lisis celular, se determinó la concentración de proteína total del sobrenadante y el lisado total, por el método de Lowry (Lowry O. et al, 1951).

Para la electroforesis, se cargaron 30 µg de proteína total, tanto del sobrenadante, como del lisado celular en cada pozo de un gel de acrilamida al 10%. Como control positivo se usó la porina OmpC purificada, 0.5 µg de porina nativa y 0.5 µg de porina desnaturalizada (sometida a 96°C por 10 minutos). La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V) durante 1.5 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF previamente activada con metanol, durante 16 h a amperaje constante (80 mA).

La presencia de proteínas en la membrana se verificó con rojo Ponceau, y posteriormente se lavó con PBS. La membrana se bloqueó con leche en PBS al 5% toda la noche, a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces con PBS y se incubó 2.5 horas a temperatura ambiente con el suero de ratón anti-OmpC (1:500) en PBS-Tween al 0.05% con leche descremada al 5%. La membrana se lavó tres veces con PBS-Tween al 0.05% y se incubó 1.5 h con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP (1:4000) en PBS-Tween al 0.05% con leche descremada al 5%. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.05% y se reveló con el reactivo de quimioluminiscencia (Luminata Crescendo, Merck) en el equipo Fusion X.

Dot Blot

Se cargaron 30 µg de proteína total, tanto del sobrenadante, como del lisado celular en la membrana con ayuda de una fuente de vacío. La membrana se trató exactamente de la misma forma como se procedió en el Western Blot.

Inmunofluorescencia de trasfectantes

Células HEK 293 FT, una línea celular renal embrionaria inmortalizada de origen humano, fueron transfectadas con las construcciones de interés fueron sembradas en placas de 6 pozos con medio DMEM. El medio se retiró 48 horas post transfección, y se incubó por 20 min en paraformaldehído (PFA) al 4% por 20 minutos para fijar las células. Las células se lavaron con PBS 1x y se permeabilizaron con PBS-tritón X-100 al 0.1% por 15 minutos. Las células se lavaron con PBS y posteriormente se bloquearon 30 minutos con PBS-albúmina al 1% y suero humano diluido 1:500. Las células se lavaron con PBS y posteriormente se adicionó suero de ratón anti-OmpC diluido 1:200 en PBS-Tween 0.05% y se incubaron las células a 4°C toda la noche en una cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS-Tween 0.05% y se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón IgG-Alexa 647 diluido en PBS-Tween 0.05% por 30 minutos, posteriormente se lavaron y se adicionó una gota de medio de montaje Vectashield y se procedió al montaje en portaobjetos. Las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal invertido A1 (Nikon) en el Laboratorio de Microscopía avanzada del Centro de Instrumentos de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS.

Inoculación de ratones para detección de OmpC en tejido

Ratones C57 B6-IA^b-GFP de 6-8 semanas de edad, los cuales expresan la proteína GFP acoplada al MHCII, fueron inmunizados en cada oreja vía intradérmica con 50 µg de plásmido (100 µg en total) disuelto en 20 µL de solución salina. Grupos de 2-3 ratones fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 horas post inmunización; así como a los 7 y 14 días. De cada uno de los ratones se obtuvieron los ganglios drenantes, el bazo y orejas.

PCR de DNA genómico

A partir de cada uno de los órganos obtenidos de los ratones a los diferentes tiempos, se realizó la extracción de DNA genómico usando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acuerdo con las instrucciones del Kit, partiendo de tejido lisado con nitrógeno líquido. A partir de 200 ng de DNA genómico, se realizó la PCR tal y como fue descrita anteriormente.

Inmunofluorescencia de oreja

Para la detección de OmpC *in vivo* se inmunizaron ratones C57 B6-IA^b-GFP de 6-8 semanas de edad en la oreja vía intradérmica con el plásmido TPA-OmpC Wt. Estos ratones expresan la proteína GFP fusionadas con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (GFP-MHCII).

Para la detección de la proteína OmpC se empleó la técnica de Inmunofluorescencia a partir de orejas obtenidas de los ratones inmunizados. Las orejas fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes histológicos en el Laboratorio de Microscopía avanzada de la Coordinación de Investigación en salud del IMSS.

El anticuerpo primario fue obtenido a partir del suero contra la porina obtenido de los ratones BALB/c (descritos arriba en el punto), inmunizados con la porina OmpC purificada. Como anticuerpo secundario el Alexa Fluor 405 anti-IgG de ratón. Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia confocal.

IX. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Se adoptaron procedimientos y técnicas que evitaron el uso de animales. Se utilizó la cantidad mínima de animales que permita la obtención de resultados consistentes y válidos.

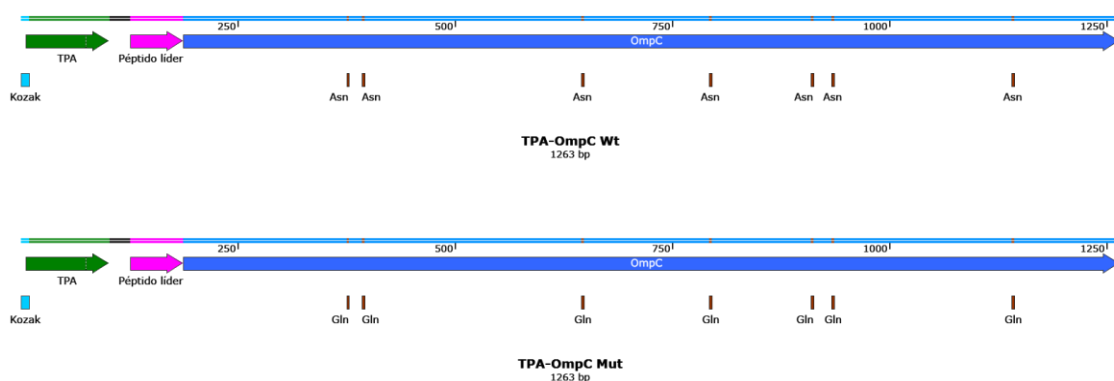
Todos los experimentos se realizaron siempre cumpliendo con los procedimientos antes mencionados. Los ratones se mantuvieron en el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM y se manejarán de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

La línea celular y cultivos primarios se manejan en una campana de bioseguridad nivel 2.

X. RESULTADOS

1. Amplificación y purificación de las vacunas de DNA

Para cumplir el objetivo 1, células calcio-competentes de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con 5 ng de DNA de cada uno de los plásmidos (Figura 3) y fueron sometidas a un choque térmico de recuperación. Las transformantes se sembraron en placas con medio LB con kanamicina (100 μ g/ mL) y se incubaron a 37°C toda la noche; al día siguiente se seleccionaron un par de colonias para verificar la presencia del inserto mediante la técnica de PCR. Una vez verificada su presencia, esas mismas colonias fueron amplificadas para la obtención y purificación de los plásmidos. A cada uno de ellos se les realizó PCR, análisis de restricción y verificación de secuencias por secuenciación capilar.



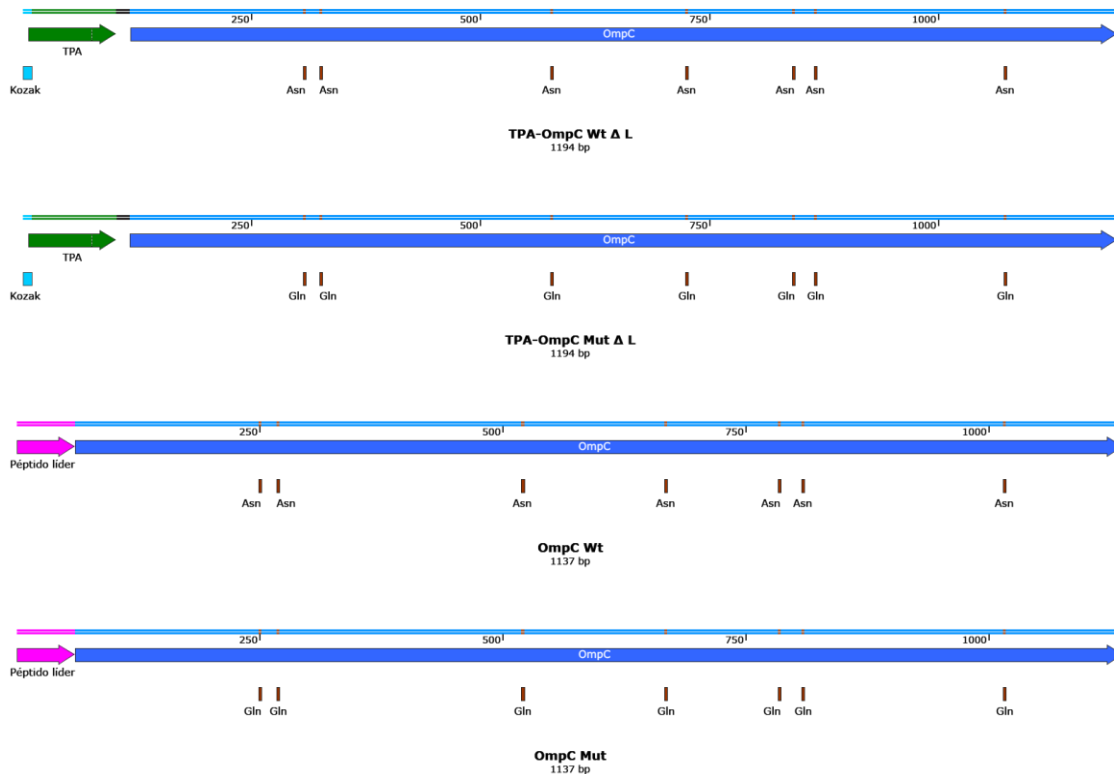


Figura 3. Plásmidos. Seis plásmidos diferentes fueron diseñados para evaluar la expresión del gen *OmpC*. En color azul claro se indica la secuencia Kozak. En color verde la secuencia señal TPA. En color magenta se indica el péptido líder de la porina y en azul fuerte el resto de la proteína. En color café se encuentran indicadas los aminoácidos que fueron cambiados entre las secuencias *Wt* y *Mut*: *Gln* por *Asn*.

1.1. Las bacterias transformadas mantienen el plásmido

Se obtuvieron las bacterias transformadas con cada uno de los plásmidos (Figura 4). Como control negativo se usaron bacterias sin transformar (Figura 4A) las cuales no crecieron en placas suplementadas con kanamicina, mientras que las células transformadas con los diferentes plásmidos si mostraron crecimiento, lo cual nos indicaría que estas bacterias adquirieron el plásmido durante el proceso de transformación y lo retuvieron para su crecimiento

Las transformantes fueron analizadas por PCR de colonia utilizando los oligos flanqueantes de los insertos descritos previamente, y las colonias que dieron positivo para el transgén se seleccionaron para amplificar y purificar los plásmidos.

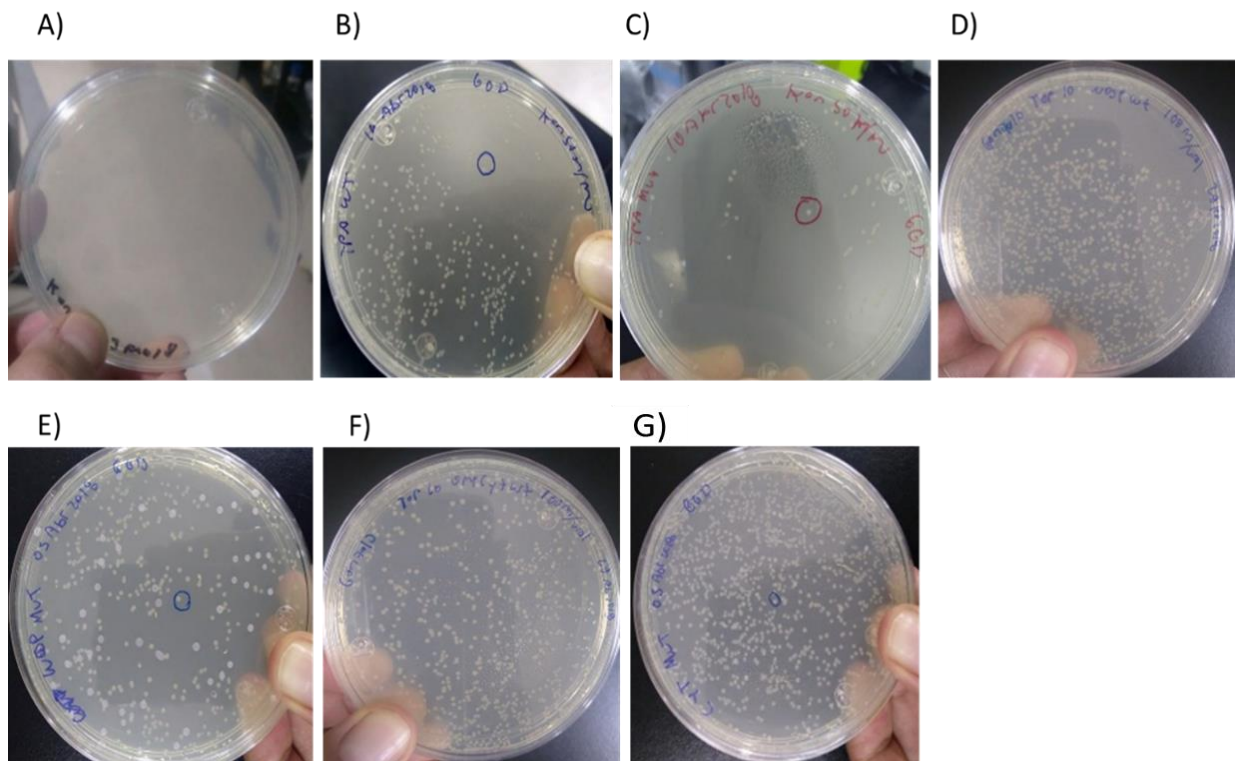


Figura 4. Bacterias DH5α 24 h post-transformación conservan el plásmido. Bacterias DH5α fueron transformadas por choque térmico con 5 ng de cada uno de los plásmidos. A) Bacterias sin transformar. B) pTPA-OmpC Wt. C) pTPA-OmpC Mut. D) pTPA-OmpC Wt Δ L. E) pTPA-OmpC Mut Δ L. F) pOmpC Wt. G) pOmpC Mut.

1.2. Plásmidos purificados mantienen el inserto.

La amplificación por PCR de colonia (Figura 5) y la amplificación por PCR utilizando como molde los plásmidos purificados (Figura 6) mostró que los productos de PCR corresponden a los tamaños esperados (desde los 1351 a los 1483 pares de bases). En la figura 5 se observa que la mayoría de las colonias seleccionadas dieron positivo a la presencia del inserto (11/12), con una banda cerca de los 1500 pb. Partiendo de estas colonias positivas, se seleccionó una para la producción y purificación a mayor escala de cada una de las construcciones.

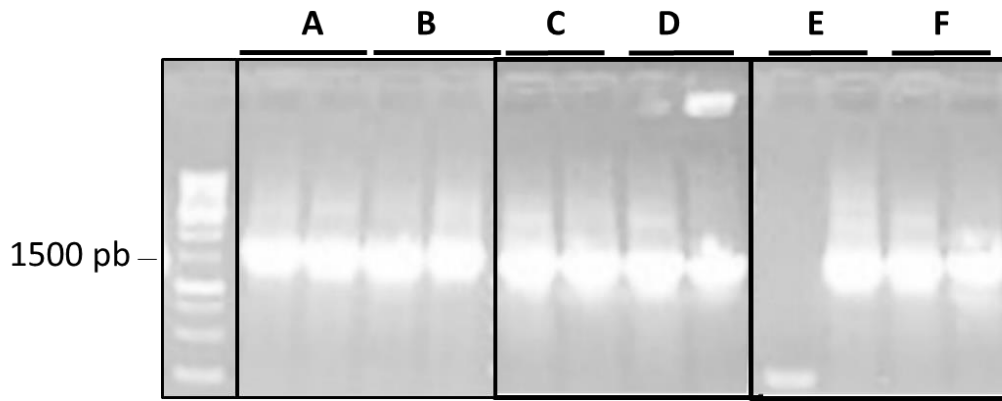


Figura 5. Colonias de bacterias DH5 α mantienen el plásmido con el inserto. PCR de colonias de células DH5 α seleccionadas para amplificar y verificar la presencia del inserto. Los tamaños esperados para las construcciones en los carriles A, TPA-OmpC Wt y B, TPA-OmpC Mut es de 1483 pb; para las construcciones en los carriles C, TPA-OmpC Wt Δ L y D, TPA-OmpC Mut Δ L de 1414 pb; para las construcciones E, OmpC Wt y F, OmpC Mut de 1351 pb.

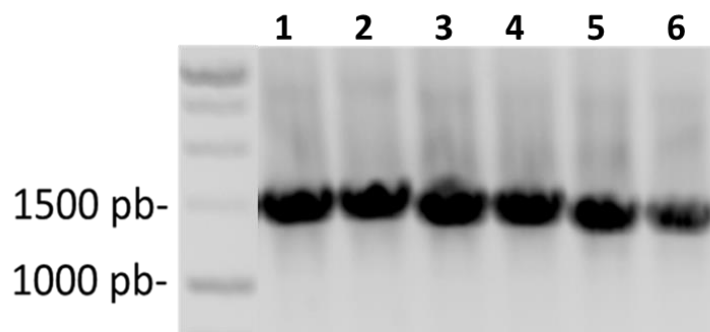


Figura 6. Los plásmidos purificados mantienen el inserto. Plásmidos purificados se sometieron a la prueba de PCR verificar la presencia del inserto. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles agarosa-TAE al 0.7 %. Los tamaños esperados para las construcciones en los carriles 1, pTPA-OmpC Wt y 2, pTPA-OmpC Mut es de 1483 pb; para las construcciones en los carriles 3, pTPA-OmpC Wt Δ L y 4, pTPA-OmpC Mut Δ L de 1414 pb; para las construcciones 5, pOmpC Wt y 6, pOmpC Mut de 1351 pb.

1.3. Los plásmidos purificados mantienen su integridad

Un segundo análisis realizado con los plásmidos purificados fue la restricción enzimática. Se realizó una digestión sencilla con la enzima de restricción Acc65 I, así como una digestión doble con las enzimas Not I y Hind III (Figura 7). Los sitios de estas enzimas están presentes en todos los plásmidos (Excepto OmpC, que no tiene sitio de Hind III). En la tabla 2 se muestran los tamaños esperados de los insertos, ya sea con una digestión sencilla, o con una digestión doble.

Tabla 2.- Tamaño de los fragmentos generados posterior a la digestión sencilla con Acc65 I y a la digestión doble con las enzimas Not I yHind III.

Plásmido	Tamaño de los fragmentos esperados	
	Digestión con Acc65 I (pb)	Digestión con Not I y Hind III (pb)
pTPA-OmpC Wt	132 y 4449	1156 y 3425
pTPA-OmpC Mut	132 y 4449	1156 y 3425
pTPA-OmpC Wt Δ L	132 y 4380	1087 y 3425
pTPA-OmpC Mut Δ L	132 y 4380	1087 y 3425
pOmpC	4449	4449
pOmpC	4449	4449

En el gel de la figura 7 se presentan los resultados de los ensayos de restricción para cada uno de los plásmidos con los fragmentos en el tamaño esperado. En los carriles número 1, las diferentes isoformas de enrollamiento del plásmido. En los carriles número 2, el plásmido linearizado. En los carriles número 3, la liberación de un inserto de alrededor de 1000 pb, producto de la digestión de la digestión doble.

Como controles se emplearon el vector original, es decir, el que contiene la flagelina, y el vector vacío. El vector con la flagelina liberó el inserto, mientras que en el plásmido vacío no se observa cambio en el patrón. En resumen, con este ensayo comprobamos que cada una de las construcciones estaba íntegra.

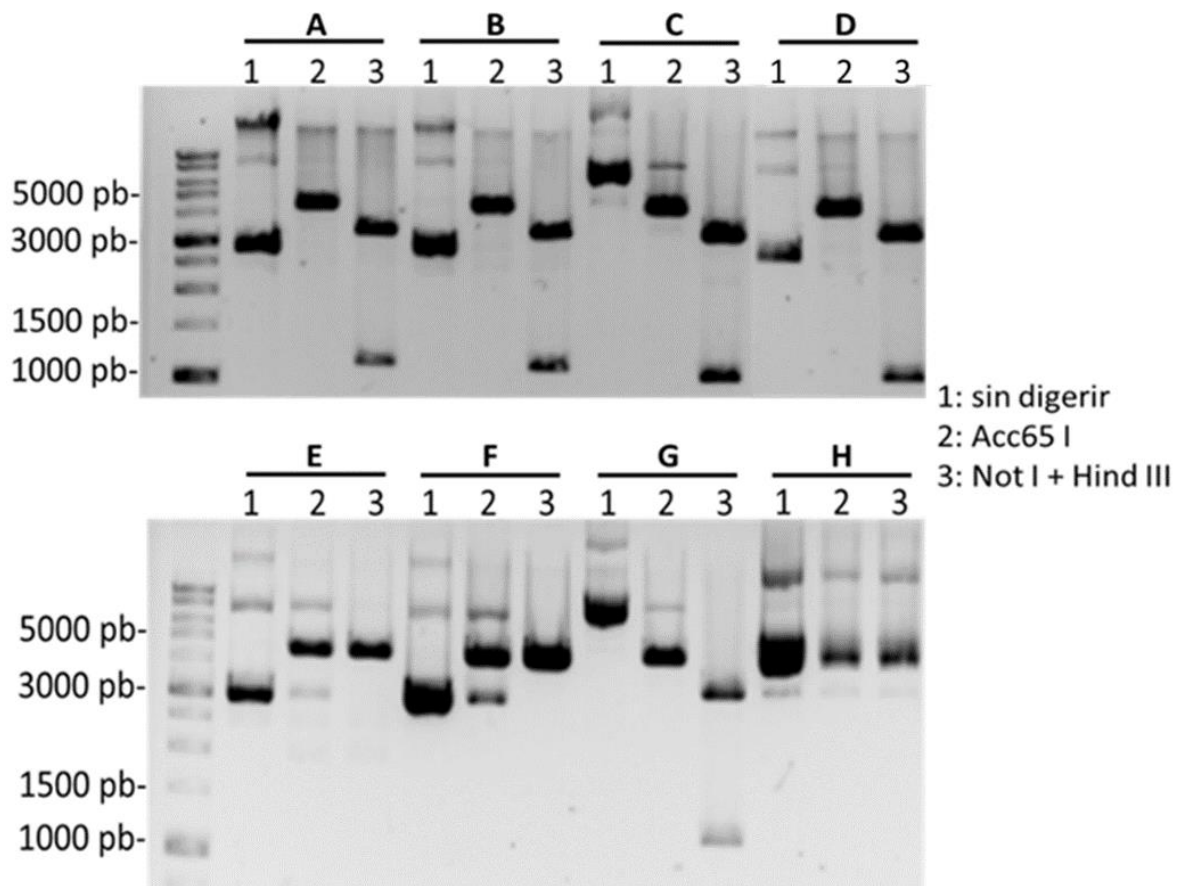


Figura 7. Análisis de restricción enzimática de los plásmidos purificados. Digestión sencilla con *Acc65 I* y digestión doble con *Hind III* y *Not I* de cada uno de los plásmidos purificados. Carriles A, *pTPA-OmpC Wt*; B, *pTPA-OmpC Mut*; C, *pTPA-OmpC Wt Δ L*; D, *pTPA-OmpC Mut Δ L*; E, *pOmpC Wt*; F, *pOmpC*; G, *pMono FliC* y H, Vector vacío (sin flagelina)

1.4. Los plásmidos mantienen la secuencia del gen *OmpC* íntegra.

Para verificar la secuencia de los segmentos clonados, los plásmidos fueron secuenciados por la técnica de secuenciación capilar (Sanger), utilizando los oligos previamente descritos. Debido a que el tamaño del gen es casi de 1500 pb, y la resolución de la secuenciación es solo de 700 pb, tuvimos que emplear dos pares de oligos. El primer par con el cual se hizo la PCR, y un segundo par, cuyas secuencias complementarias se encontraban dentro del gen *OmpC*. Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon con la secuencia original esperada y se analizaron base por base. Nuestro análisis de los alineamientos de las secuencias mostró que los segmentos clonados no presentaron cambios

puntuales en sus pares de bases. Con estos resultados procedimos a pasar al segundo objetivo.

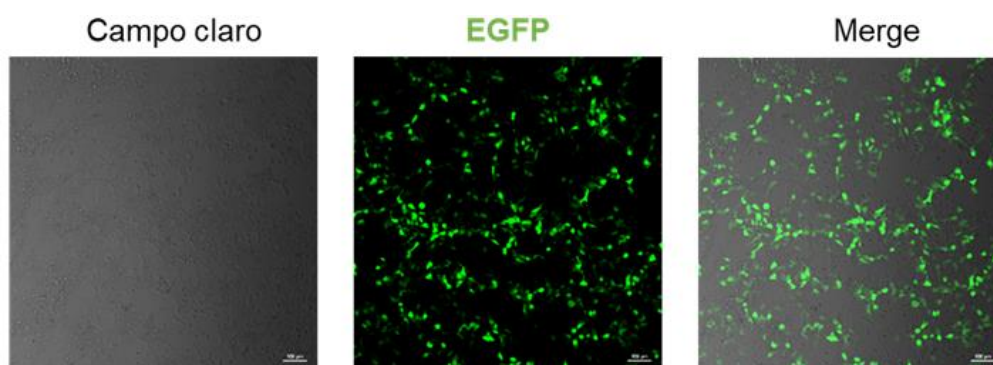
2. Células HEK 293 T expresan la porina OmpC.

Para verificar la expresión *in vitro* de la porina OmpC, se cultivaron células HEK 293 FT en placas de 6 pozos y se transfectaron con cada una de las diferentes construcciones de OmpC (2.5 μ g); la transfección se llevó a cabo con lipofectamina 3000. A las 48 horas post transfección, las células fueron cosechadas y se separó el sobrenadante del pellet celular. A partir de estas muestras, se realizaron inmunodetecciones empleando suero anti-OmpC obtenido de ratón, empleando técnicas como inmunofluorescencia, Dot Blot y Western Blot.

2.1. Establecimiento de las condiciones de transfección con pEGFP.

Las condiciones empleadas para la transfección, es decir, la cantidad de ADN y de lipofectamina 3000, fueron determinadas con base a la eficiencia de transfección determinadas por microscopía y citometría de flujo a las 48 horas post-transfección (Figura 8). Los resultados indicaron que las condiciones empleadas (1 μ g pEGFP, 2.5 μ g plásmidos y 7 μ L lipofectamina 3000) eran suficientes para alcanzar a detectar la proteína con una eficiencia de transfección buena, del 50%. A partir de eventos individuales, se seleccionaron aquellas poblaciones pertenecientes a las células vivas, y se determinó la eficiencia de transfección

A)



B)

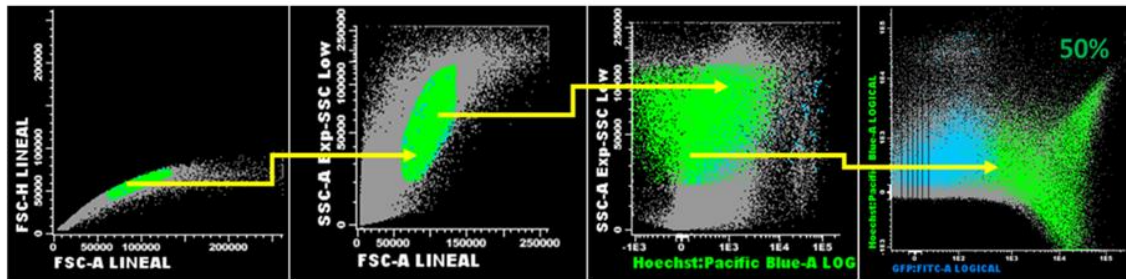


Figura 8. Estandarización para determinar las condiciones de transfección. Células HEK 293 FT, 48 horas post transfección con pEGFP. A) Microscopía confocal. B) Estrategia de citometría de flujo: A partir de células vivas, se determinó que la eficiencia de transfección fue del 50%.

2.2. El suero de ratones inmunizados con OmpC reconoce la porina OmpC.

Para las inmunodetecciones se ocupó suero de ratón específico contra la porina OmpC. Para generarlo, 10 microgramos de esta porina fueron administrados 6 veces en intervalos de 1 semana a ratones BALB/c vía intraperitoneal. Como podemos observar en la figura 9, el suero reconoce a la proteína en su conformación nativa, principalmente (monómeros 37 kDa, dímeros 75 kDa, trímeros 117 kDa), y también existe reconocimieneto hacia la parte desnaturalizada (monómeros 37 Kda).

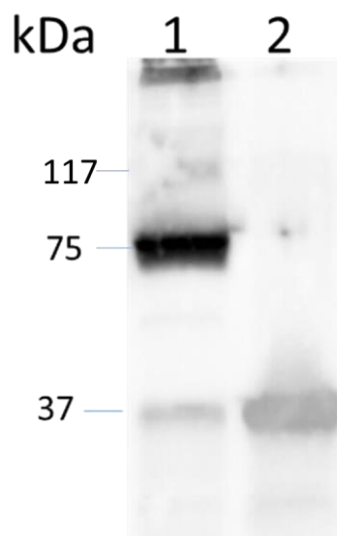


Figura 9. Suero hiperinmune reconoce la porina OmpC purificada en su conformación nativa y desnaturalizada. 1 µg de porina en su confirmación nativa (carril 1) y desnaturalizada (carril 2) fueron detectadas empleando el suero obtenido a partir de ratones BALB/c inmunizados con la porina OmpC. Pesos esperados: monómero, 36 kDa; dímero, 72 kDa.

2.3. La porina OmpC se mantiene de forma intracelular y en el sobrenadante.

Nos dimos a la tarea de ver si se encontraba de forma soluble en el sobrenadante o bien, si se mantenía dentro de la célula. Para esto, lo primero que hicimos fue un Dot Blot (Figura 10), en el cual, a partir de células transfectadas después de 48 horas, se separó el sobrenadante de la fracción celular.

De acuerdo con el Dot Blot, se aprecia una señal baja de la proteína en lo que sería el medio de cultivo (sobrenadante). Por otro lado, en las fracciones de lisado total se alcanza una señal mayor lo cual parecería indicar que hay mayor cantidad de proteína dentro de la célula.

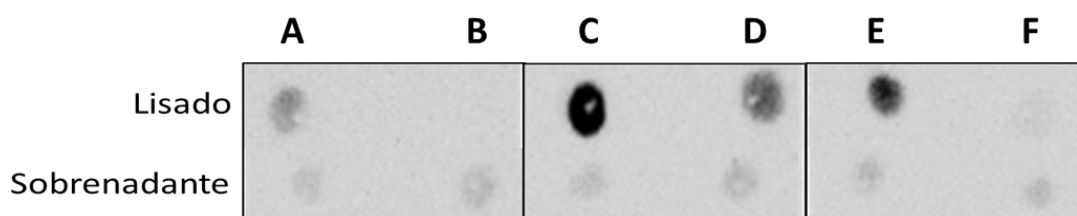


Figura 10. Las células son capaces de expresar la porina OmpC. Células HEK 293 FT transfectadas con los plásmidos que contienen el gen de OmpC, se cosecharon y lisaron a las 48 horas post transfección. La identificación de la porina se llevó a cabo mediante un Dot Blot. Anticuerpo primario, α -OmpC de ratón 1:500; anticuerpo secundario, α -IgG de ratón-HRP (1:4000): A, TPA-OmpC Wt; B, TPA-OmpC Mut; C, TPA-OmpC Wt Δ L; D, TPA-OmpC Mut Δ L; E, OmpC Wt; F, OmpC Mut.

2.4. OmpC se expresa en forma de monómeros y dímeros.

Una vez determinada la presencia de la proteína en las fracciones celulares totales y solubles, procedimos a ver cómo se expresaba la proteína. Para llevar esto a cabo, se llevó a cabo un Western Blot en condiciones nativas (Figura 11).

En las construcciones más grandes, TPA-OmpC Wt y TPA-OmpC Mut se observan unas bandas tenues en las fracciones de los lisados celulares, entre

los 50 y 35 kDa. Para las construcciones medianas, TPA-OmpC Wt Δ L y TPA-OmpC Mut Δ L, ambas presentan bandas en los carriles correspondientes a los sobrenadantes, entre los 75 y 50 kDa. Además, particularmente en la construcción TPA-OmpC Wt Δ L, aparece una banda cerca de los 50 kDa. Por último, para las construcciones de menor tamaño, OmpC Wt y OmpC Mut, se observan bandas en la fracción celular (37-50 kDa y la parte del sobrenadante (75 kDa), comportándose de forma similar a las construcciones sin péptido líder.

Se pueden apreciar dos patrones: en primer lugar, las construcciones carentes de péptido líder se observan con un peso molecular más bajo, en comparación de aquellas que sí lo tienen. Esto nos indicaría que probablemente el péptido líder sí se estaría sintetizando con la proteína completa. En segundo lugar, las construcciones Wt se encuentran en un peso mayor al compararlas con las Mut. Posiblemente esto nos indique que las células estén llevando a cabo un proceso post-traduccional, como la glicosilación en el sitio consenso remanente en el asa externa de la porina.

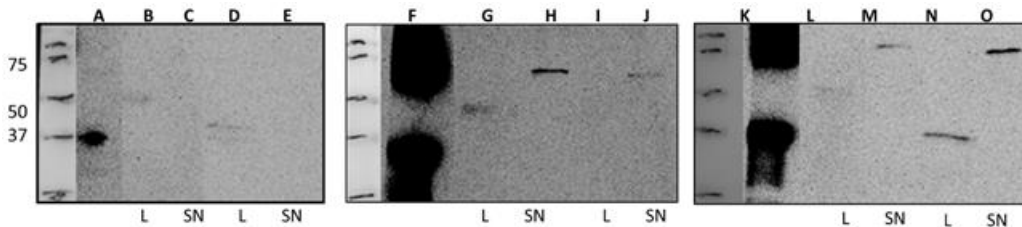


Figura 11. La porina OmpC se expresa en su conformación monomérica y dimérica. Células HEK 293 FT transfectadas con las vacunas de DNA se cosecharon y lisaron a las 48 horas post transfección. Se analizaron por separado el lisado celular y el sobrenadante (medio de cultivo). En la fracción celular predomina la conformación monomérica, mientras que en el sobrenadante la conformación dimérica. Las proteínas expresadas por las construcciones WT tienen un mayor peso a comparación de las Mut. Anticuerpo primario, α -OmpC de ratón 1:500; anticuerpo secundario, α -IgG de ratón-HRP (1:4000). A, F y K, OmpC purificada; B y C, TPA-OmpC Wt; D y E, TPA-OmpC Mut; G y H, TPA-OmpC Wt Δ L; I y J, TPA-OmpC Mut Δ L; L y M, OmpC Wt; N y O, OmpC Mut; L: lisado, SN: sobrenadante.

2.5. Las células HEK 293 FT producen la porina OmpC recombinante.

Células HEK 293 FT transfectadas con cada uno de los plásmidos y cultivadas sobre cubreobjetos fueron teñidas a las 48 horas post transfección (Figura 12).

Observamos en color rojo la porina OmpC recombinante marcada con Alexa Fluor 647, la cual parece estar de forma citoplasmática. En azul los núcleos teñidos con DAPI, y finalmente las imágenes sobrepuestas. como control negativo se empleó el vector vacío, donde no se observa señal del color rojo.

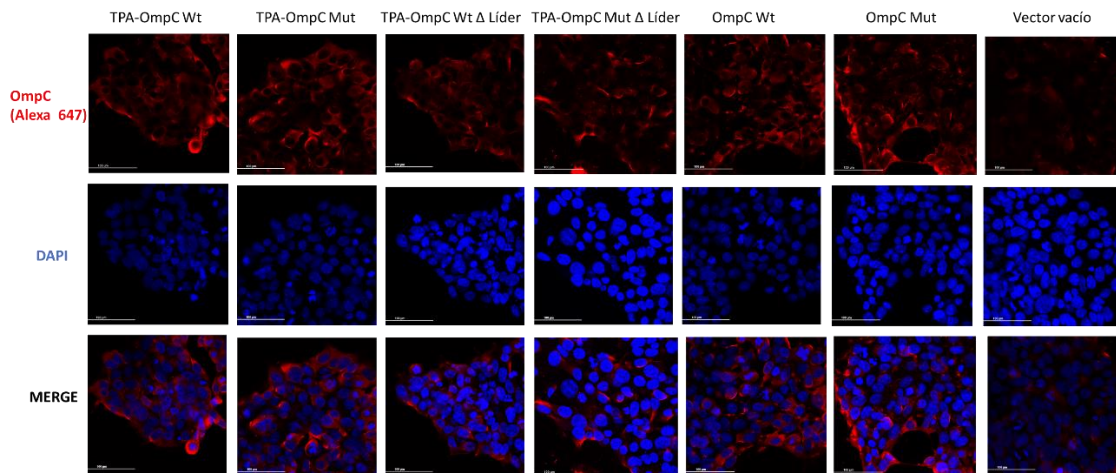


Figura 12. Las células HEK 293 FT transfectadas con los plásmidos expresan la porina OmpC. Inmunofluorescencia de células HEK 293 transfectadas con los plásmidos a las 48 horas post transfección. La porina se distribuye en regiones perinucleares y citoplasmáticas. Azul, núcleos teñidos con DAPI; Rojo, OmpC marcada con Alexa Fluor 647.

3. Distribución del plásmido y expresión de la porina OmpC en un modelo de ratón.

El objetivo 3 consistió en determinar la distribución del plásmido en los órganos linfoides, proceso de infiltrado celular y la expresión de la proteína en el sitio de inmunización, empleando un modelo de ratón. Para esto, se inyectaron 50 microgramos de plásmido de forma intradérmica en cada oreja de ratones C57 B6-IA^b-GFP, los cuales expresan la proteína GFP acoplada al MHCII. Los ratones fueron sacrificados y se les extrajeron los ganglios drenantes, el bazo y la misma oreja a diferentes tiempos (24, 48, 72 horas y 7 días). A partir de estos, se extrajo DNA genómico para detectar el plásmido en los mismos.

3.1. El plásmido se mantiene en el sitio de inmunización y es transportado al ganglio drenante.

Muchas de las vacunas génicas actuales contienen la secuencia señal TPA, por lo que decidimos experimentar con las construcciones las cuales tienen el gen

de la porina OmpC completo, fusionada a la secuencia señal. A partir de un ratón inyectado con un el plásmido de mayor tamaño, TPA-OmpC Wt, se obtuvo la oreja 24 horas post inmunización para la extracción del DNA genómico. Podemos observar en el gel la amplificación del gen OmpC indicando que el plásmido estaba presente (Figura 13A), en el cual, el carril número uno es el amplicón de un plásmido purificado, el carril número dos es el producto de PCR del DNA genómico extraído, el carril número tres es el control sin DNA y el carril número cuatro es DNA genómico de ratón sin inocular DNA

Ratones inmunizados fueron sacrificados para la obtención de los órganos previamente mencionados (Figura 13B). Podemos observar que las construcciones se mantienen hasta 7 días después de la inmunización en las orejas, y que estas son transportadas a los ganglios linfáticos drenantes. Sin embargo, no lo encontramos en el bazo.

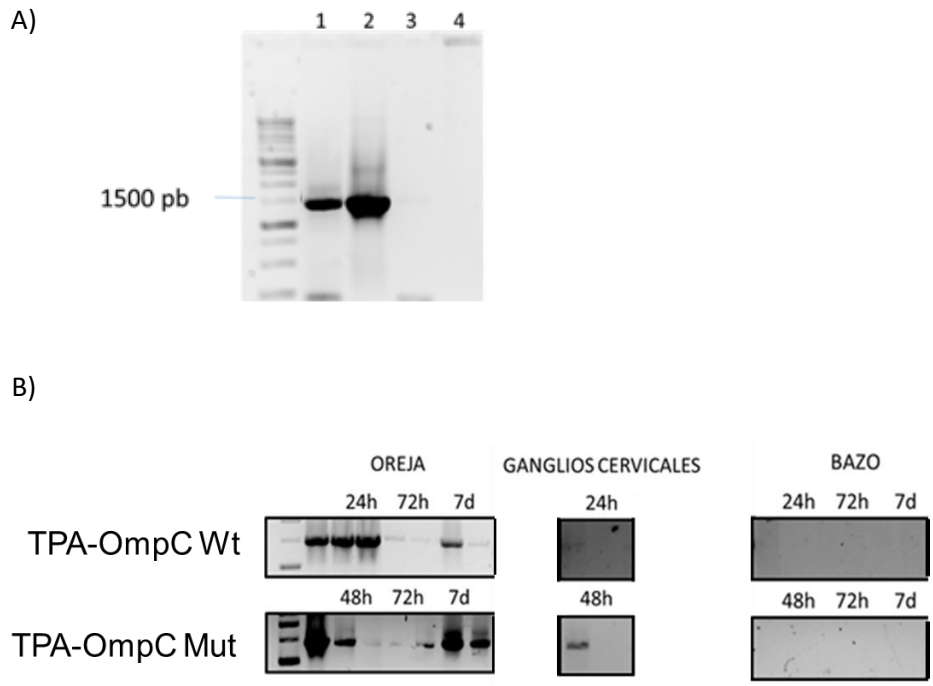


Figura13. El plásmido se mantiene en el sitio de inmunización y es transportado al ganglio linfático drenante. PCR de DNA genómico y plasmídico de órganos de ratones inmunizados con los plásmidos TPA-OmpC Wt y TPA OmpC Mut. A) Estandarización de la técnica1, TPA-OmpC Wt purificado; 2, DNA genómico de oreja de ratón 24 horas post inmunización; 3, muestra sin

DNA; 4, DNA genómico de oreja de ratón sin inmunizar. B) Distribución de los plásmidos en oreja, ganglios cervicales y bazo a diferentes tiempos.

3.2. La porina OmpC se expresa en el sitio de inmunización.

Por último, se llevó a cabo el experimento para la detección de la porina recombinante en el sitio de inyección (Figura 14). Esto se realizó mediante inmunofluorescencia en los cortes obtenidos de los tejidos, tratando las muestras con el suero específico contra la porina y el Alexa Fluor 405. Como control positivo se empleó la porina OmpC de *S. Typhi* purificada.

En la columna izquierda apreciamos las células teñidas con HOECHST (intercalador de DNA). En la columna de en medio la porina teñida con el Alexa Fluor 405, y en la tercera columna, la imagen compuesta. Observamos claramente que la porina está distribuida a lo largo del tejido. Además, la intensidad de la porina aumenta a las 48 horas post inmunización.

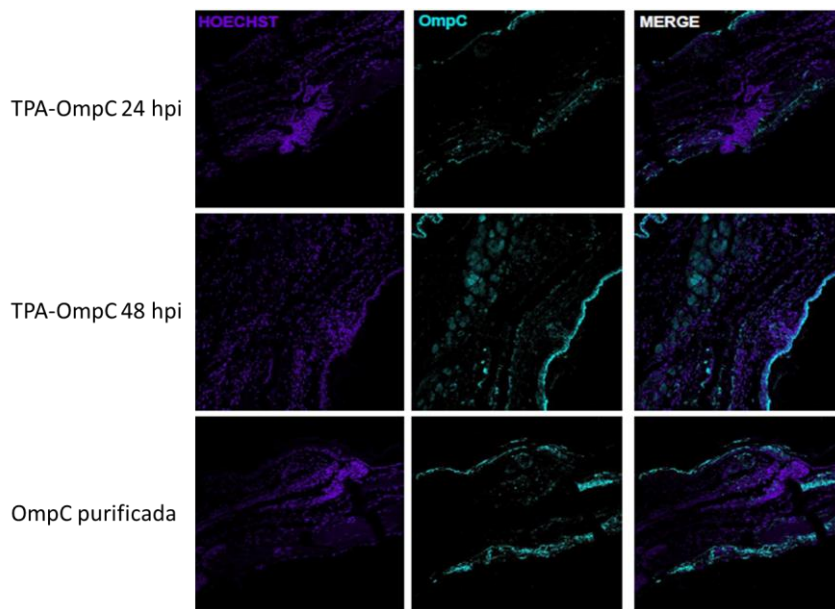


Figura 14. La proteína OmpC recombinante se expresa en el sitio de inmunización. Inmunofluorescencia de las orejas inmunizadas con la porina OmpC y el plásmido TPA-OmpC WT. Morado: Hoechst. Azul claro: OmpC.

Con estos resultados, logramos demostrar que la porina OmpC se puede expresar en diferentes maneras (peso y modificaciones postraduccionales), en

un sistema *in vitro*. Además, la proteína también se produce en el sitio de inmunización, en el modelo de ratón.

XI. DISCUSIÓN

En este trabajo se expresó la porina OmpC de *S. Typhi* libre de LPS en un sistema heterólogo de expresión en células de mamífero, usando seis plásmidos diferentes que contienen el gen que codifica para la proteína OmpC. Las construcciones fueron sintetizadas y optimizadas para favorecer y aumentar la expresión del antígeno en células de mamífero. Se ha observado que la optimización de codones empleados por células eucariontes aumenta la expresión del antígeno, y esto a su vez, potencia la respuesta inmune humoral, tanto como la respuesta inmune celular (André S. et al, 1998). En un estudio realizado por Ko H. y colaboradores en el 2005, al optimizar la secuencia del antígeno Ag85B de *Mycobacterium* con codones de mamífero, se observa un aumento en la expresión del antígeno *in vitro*.

Además de la optimización de codones, la secuencia líder TPA fue añadida a algunas construcciones. La adición de esta secuencia, la cual ha sido empleada en vectores para uso en humanos (Satti, I. et al, 2014; Bos, R., et al, 2020), así como otras secuencias líderes, son factores que tienen efecto sobre la expresión y localización celular del antígeno. Esto genera una modulación de las vías del procesamiento y presentación del antígeno, ya sea a través de MHC I, MHC II o presentación cruzada, y con ello, favorecer cierto tipo de respuesta inmune inducida, ya sea humoral, o mediada por células T (Alharbi, N. K., et al, 2017; Azam Bolhassani & Sima Rafati Yazdi, 2009).

En varios trabajos con vacunas de DNA, previo a la inmunización se realizan transfecciones en sistemas heterólogos de expresión para verificar que la proteína en estudio se expresara (Kurupati P. et al, 2010; Liu, F. et al, 2017; López-Camacho, C. et al, 2018). Kurupati y colaboradores clonaron y expresaron la porina OmpK36 de *K. pneumoniae* en células de mamífero antes de realizar la inmunización con la proteína recombinante (Kurupati P. et al, 2010). Para comprobar la expresión de la porina OmpC en células de mamífero se realizó una transfección *in vitro* y posteriormente se detectó a través de diferentes técnicas de inmunodetección: Dot Blot, Western Blot, e Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia de las células transfectadas con nuestros plásmidos no mostró que existe diferencia alguna en la localización celular de la porina en los compartimentos celulares, a diferencia de otros estudios (López-Camacho, C. et al, 2018; Wen, B. et al, 2010). Sin embargo, los resultados del Dot Blot y Western Blot indican que la proteína se encuentra tanto en el lisado celular, como en el sobrenadante (medio de cultivo).

En el Western Blot de los lisados celulares y de los sobrenadantes se observa una diferencia en la organización estructural de la porina. Mientras que en el lisado celular predomina la conformación monomérica de la porina, en el sobrenadante predomina el dímero. En diferentes trabajos se ha evaluado la expresión de diferentes porinas de diferentes bacterias Gram negativas, y al realizar los correspondientes Western Blot para evaluar la expresión, sólo observan la conformación monomérica (Liu, F. et al, 2017; Wang Q. et al, 2011). Algo semejante pudiera estar pasando al expresar la porina OmpC *in vitro*, pero no sabemos exactamente cómo es que se estuviera ensamblando en la conformación dimérica.

De manera interesante, se puede apreciar que los monómeros de las construcciones Wt tienen un peso mayor a las construcciones Mut, lo cual sugiere que la maquinaria de las células eucariontes está realizando algunas modificaciones postraduccionales, las cuales son responsables del aumento del tamaño de la porina (Jenkins, N. et al, 2008) Es importante recordar que las construcciones Wt tienen accesibles los sitios de glicosilación. Estas modificaciones postraduccionales, principalmente la glicosilación podría alterar la inmunogenicidad y capacidad antigénica de la porina, ya sea enmascarando epítomos lineales o generando epítomos conformacionales (Lisowaka E., 2002).

Otra diferencia observada entre las proteínas expresadas es que, aquellas que no tienen el péptido líder (TPA-OmpC Wt Δ L y TPA-OmpC Mut Δ L) tienen un menor peso con respecto a las que sí lo tienen. En la bacteria, el precursor de la proteína OmpC, aquella que tiene el péptido líder (pre-OmpC) tiene una secuencia con 21 aminoácidos adicionales a la OmpC madura (uniprot.org). Esto sugiere que la célula está sintetizando la proteína OmpC en su forma inmadura, y no está sufriendo el proceso de proteólisis normal, tal y como ocurre en las bacterias Gram negativas (Gatsos X. et al, 2008).

Posterior a la transfección *in vitro*, se inyectaron ratones C57 B6-IA^b-GFP de forma intradérmica en la oreja, esto con el fin de determinar la expresión de la porina en el sitio de inmunización, así como la distribución del plásmido en los órganos linfoides (Hengge, U. R. et al, 2001; Rush, C. M. et al, 2010). La piel es un sitio rico en células presentadoras de antígeno (APCs), tales como células de Langerhans (LC), células dendríticas dermales (dDC) y macrófagos derivados de monocitos (moMØ). Las células CD14⁺ dDC pueden migrar rápidamente de la piel al ganglio, y constituyen del 20-40% de las DCs en el nódulo linfático (Bigley V. et al, 2015; Kashem S. et al, 2017), las cuales podrían procesar el antígeno y presentarlo a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. En los resultados se observa que el plásmido permanece en el sitio de inmunización hasta los 7 días, pero también este es transportado al ganglio. Esto podría ser debido al transporte por vía de células dendríticas activadas por la vía de TLR9 (Spies, B. et al, 2003; Cornélie, S. et al, 2004) o por difusión a través del sistema linfático.

Se ha propuesto que la cantidad del antígeno expresado es proporcional a la respuesta inmunogénica y capacidad protectora (Greenland J.R. et al, 2007; Lorenzen E. et al, 2005). Estudios han demostrado que, una vez inyectado el plásmido, el antígeno empieza a expresarse como proteína a partir de las 24 horas (Mendoza, J., et al, 2013), y alcanza el pico máximo hasta los 14 y 21 días post inmunización, al menos en el sitio de inmunización. Al inyectar el plásmido se observó la expresión de la porina OmpC en la oreja. Los resultados muestran que a partir de las 24 horas esta comienza a expresarse en el sitio de inyección.

En conclusión, en este trabajo demostramos que es posible generar la porina OmpC de forma recombinante empleando un sistema heterólogo de expresión. Una vez inyectado, el plásmido se mantiene en el sitio de inmunización hasta 7 días, pero puede ser transportado al ganglio drenante. Además, la porina también se expresa en el sitio de inmunización.

Con estos resultados se abren nuevas puertas de investigación. Por ejemplo, el uso de estos plásmidos como vacunas de DNA y evaluar las propiedades inmunogénicas y capacidad protectora contra el patógeno, la generación de un sistema heterólogo de expresión para la producción de porinas recombinantes a mayor escala, y el empleo de los plásmidos para generar otras plataformas vacunales, como lo son los vectores virales recombinantes.

XII. Perspectivas

1. Emplear los vectores como vacunas de DNA y analizar la inmunogenicidad, a través de la inmunización en ratones y evaluar la presencia de anticuerpos y células T específicos contra la porina OmpC de *S. Typhi*.
2. Evaluar la capacidad protectora de las vacunas de DNA en ratones ante el reto con *S. Typhi*.
3. Emplear los plásmidos para la generación de otras plataformas vacunales: adenovirus.
4. Emplear los plásmidos para producir la porina OmpC en células eucariontes

XIII. REFERENCIAS

Acheson D. et al. Nontyphoidal Salmonellosis. *Clin Infect Dis.* 2001; 32(2):263–9.

Alharbi N. et al. ChAdOx1 and MVA based vaccine candidates against MERS-CoV elicit neutralising antibodies and cellular immune responses in mice. *Vaccine.* 2017; 35(30), 3780–3788.

Andrade V. et al. INO-4800 DNA vaccine induces neutralizing antibodies and T cell activity against global SARS-Cov-2 Variants. *npj Vaccines.* 2021; 6:121.

Sinha A. et al. Typhoid fever in children aged less than 5 years. *Lancet.* 1999; 354(9180):734–7.

Balasubramaniam D. et al. Asymmetric pore occupancy in crystal structure of OmpF porin from *Salmonella typhi*. *J Struct Biol.* 2012; 178(3):233–44.

Balasubramaniam D. et al. Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141high XCR1+ dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 2014; 97(4), 627–634.

Blanco F. et al. Human Cell Mediated Immunity to Porins from Salmonella typhi. *Scand J Infect Dis.* 1993; 25(1):73–80.

Bobat S. et al. Soluble flagellin, FliC, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of Salmonella typhimurium infection. *Eur J Immunol.* 2011.

Bos R. et al. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *Npj Vaccines.* 2020; 5(1).

Browne A. et al. Drug-resistant enteric fever worldwide, 1990 to 2018: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2020.

Cevayir C. et al. A simple DNA sensing matter? *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2013; 9:10, 2216–2221.

Chattergoon M. et al. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen presenting cells. *J. Immunol.* 1998; 160:5707.

Cornélie S. et al. Direct Evidence that Toll-like Receptor 9 (TLR9) Functionally Binds Plasmid DNA by Specific Cytosine-phosphate-guanine Motif Recognition. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279(15), 15124–15129.

Davis B. et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a non-infectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol.* 2001; 75:4040–4047.

Delogu G. et al. DNA vaccine combinations expressing either tissue plasminogen activator signal sequence fusion proteins or ubiquitin-conjugated antigens induce sustained protective immunity in a mouse model of pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunology.* 2002; 70: 292-302.

Denies S. et al. Recent progress in canine tumor vaccination: potential applications for human tumor vaccines. *Exp Rev Vaccines.* 2012; 11:1375–138.

DGE. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Vol. Semana 1, Boletín Epidemiológico. 2018.

Dominika H. & Matthias B. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19, 3605.

FDA. Guideline for validation of the LAL test as an end-product endotoxin test for human and biological drug products, 1987.

Fynan E. et al. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:11478– 11482.

Garver K. et al. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Dis Aquat Organ.* 2005; 64:13–22.

Gatsos X. et al. Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 2008; 32(6), 995–1009.

Greenland J. et al. Plasmid DNA Vaccine-Elicited Cellular Immune Responses Limit In Vivo Vaccine Antigen Expression through Fas-Mediated Apoptosis. *The Journal of Immunology.* 2007; 178(9), 5652–5658.

Grosenbaugh D. et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res.* 2011; 72:1631–1638.

Hashizume T. et al. The Vaccine Potential of Heat-killed Attenuated Strain of *Salmonella*. *Int Journal Oral-Medical Sci.* 2015; 14(2 3):54–60.

Hengge. U et al. Safety and Pharmacokinetics of Naked Plasmid DNA in the Skin: Studies on Dissemination and Ectopic Expression Presented in part at the 28th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Montpellier, France. *Journal of Investigative Dermatology.* 2001; 116(6), 979–982.

Hermann J. DNA vaccines against enteric infections. *Vaccines.* 2006; 24: 3705-3708.

Hirao L. et al. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine.* 2008; 26(3), 440–448.

Hunter J. et al. CDC Yellow Book 2018: Health Information for International Travel. (Ed. Brunette, G. W) Ch. 3, 304–305

<https://www.sinave.gob.mx/>

<https://www.inovio.com/>

Isibasi A. et al. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine*. 1992; (10):811–3.

Kashem S. et al. Antigen-Presenting Cells in the Skin. *Annual Review of Immunology*. 2017; 35(1), 469–499.

Kodama C. et al. *Salmonella* flagellin is not a dominant protective antigen in oral immunization with attenuated live vaccine strains. *Infect Immun*. 2004; 72(4):2449–51.

Koprowski H. et al. DNA vaccination/ Genetic Vaccination. *Current topics in mmicrobiology and immunology*. 1998; 226: 5-13.

Kurupati P. et al. Protective Efficacy of DNA Vaccines Encoding Outer Membrane Protein A and OmpK36 of *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010; 18(1).

La Cava A. et al. Cell-Mediated DNA Transport Between Distant Inflammatory Sites Following Intradermal DNA Immunization in the Presence of Adjuvant. *The Journal of Immunology*. 2000; 164(3), 1340–1345.

Lisowska E. The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002; 59(3), 445–455.

López-Macías C. et al. Induction of Antibodies against *Salmonella typhi* OmpC Porin by Naked DNA Immunization. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 772 (1), 285-288.

Lorenzen E. et al. Time course study of in situ expression of antigens following DNA-vaccination against VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry. *Fish & Shellfish Immunology*. 2005; 19(1), 27–41.

Lowry O. et al. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1), 265–275.

- Luciana C. et al. Technological Microbiology: Development and Applications. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8 (827)
- MacLennan C. et al. Dysregulated Humoral Immunity to Nontyphoidal Salmonella in HIV-Infected African Adults. *Science*. 2010; 328(5977):508–12.
- Majowicz S. et al. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(6):882–9.
- Mammen P. et al. Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a randomized, blinded, placebo-controlled, Phase 2 clinical trial in adults at high risk of viral exposure. *MedRxiv*. 2021.
- Mendoza J. et al. Elucidating the Kinetics of Expression and Immune Cell Infiltration Resulting from Plasmid Gene Delivery Enhanced by Surface Dermal Electroporation. *Vaccines*. 2013; 1(3), 384–397.
- Moreno M. et al. Salmonella Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology*. 2013.
- Okoro C. et al. Intracontinental spread of human invasive Salmonella Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat Genet*. 2012; 44(11):1215–21.
- Orth G. et al. Infectious and oncogenic effect of DNA extracted from cells infected with polyoma virus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1964; 115:1090–1095.
- Israel M. et al. Biological activity of polyoma viral DNA in mice and hamsters. *J Virol*. 1970; 29:990–996.
- Lee S. et al, Dual Immunization with SseB/Flagellin Provides Enhanced Protection against Salmonella Infection Mediated by Circulating Memory Cells. *The Journal of Immunology*. 2017; 199(4), 1353–1361.
- Perez-Shibayama C. et al. IFN-gamma-Producing CD4+ T Cells Promote Generation of Protective Germinal Center-Derived IgM+ B Cell Memory against Salmonella Typhi. *J Immunol*. 2014.

Pérez M. et al. Salmonella typhi porins OmpC and OmpF are potent adjuvants for T-dependent and T-independent antigens. *Front Immunol.* 2017.

Porgador A. et al. Predominant Role for Directly Transfected Dendritic Cells in Antigen Presentation to CD8+T Cells after Gene Gun Immunization. *The Journal of Experimental Medicine.* 1998; 188(6), 1075–1082.

Rapoport T. et al. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 2007; 450(7170), 663–669.

Reddy E. et al. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10(6):417–32.

Ruchi R. et al. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology,* 2017; 1494.

Salazar-González R. et al. Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol Lett.* 2004; 93: 115- 122.

Sardesar N. et al. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Current opinion in immunology.* 2011; 23(3), 421–429.

Secundino I. et al. Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 2006; 117(1):59–70.

Spies B. et al. Vaccination with Plasmid DNA Activates Dendritic Cells via Toll-Like Receptor 9 (TLR9) but Functions in TLR9-Deficient Mice. *The Journal of Immunology.* 2003; 171(11), 5908–5912.

Stanaway J. et al. The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Infectious Diseases.* 2019.

Stanley A. Vaccines: The Fourth Century. *Clinical And Vaccine Immunology.* 2009; 12(16) 1709-1719.

Sun K. et al. Distribution characteristics of DNA vaccine encoded with glycoprotein C from Anatid herpesvirus 1 with chitosan and liposome as deliver carrier in ducks. *Virology Journal*. 2013; 10(1), 89.

Svenson S. et al. Artificial Salmonella vaccines: Salmonella typhimurium O-antigen-specific oligosaccharide-protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. *Infect Immun*. 1981; 32(2):490–6.

Tang D. et al. PAMPS and DAMPS: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunological Reviews*. 2012; 249: 158-175.

Tennant S. & Levine M. Live attenuated vaccines for invasive Salmonella infections. *Vaccine*. 2015; 33 Suppl 3:C36-41.

Ulmer J. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993; 259:1745–1749.

<https://www.uniprot.org/uniprot/P06996>

Vega M. et al. A Salmonella typhi OmpC fusion protein expressing the CD154 Trp140-Ser149 amino acid strand binds CD40 and activates a lymphoma B-cell line. *Immunology*. 2003; 110(2):206–16.

Wang. B et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:4156–4160.

Wang Q. et al. Identification and evaluation of an outer membrane protein OmpU from a pathogenic *Vibrio harveyi* isolate as vaccine candidate in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Letters in Applied Microbiology* 2011; 53(1), 22–29.

WHO. Typbar TCV® from Bharat Biotech, World's First Typhoid Conjugate Vaccine Prequalified by WHO. 2018 [cited 2018 Feb 21]; Available from: <http://www.who.int/medicines/news/2017/Bharat-Biotech-TypbarTCV-WHO-PQ-Press-Release-Global-Final.pdf>

Will H. et al. Infectious hepatitis B virus from cloned DNA of known nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82:891–895.