

300627

7
ZET



UNIVERSIDAD "LA SALLE"

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA UNAM

"CARACTERIZACION DE PEPTIDOS DE PORINA
Omp C DE *Salmonella typhi* QUE SE UNEN A
MOLECULAS DE CLASE I DEL COMPLEJO
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD
MURINO".

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
LETICIA CASTELLANOS PALMA

ASESOR DE TESIS: Q. B. P. GUADALUPE MORALES MEZA



MEXICO, D. F.

JULIO 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica,
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto
Mexicano del Seguro Social; bajo la tutoría del Dr. Vianney Francisco Ortiz-
Navarrete.**

México, D.F. a 4 de Abril de 1995.

**DIRECCION GENERAL DE INCORPORACION
Y REVALIDACION DE ESTUDIOS
P R E S E N T E.**

A quien corresponda:

La presente es con el fin de informar a usted que la Tesis de Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica de la Srta. LETICIA CASTELLANOS PALMA, titulada:

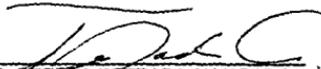
"CARACTERIZACION DE PEPTIDOS DE PORINA *Omp C* DE *Salmonella typhi* QUE SE UNEN A MOLECULAS DE CLASE I DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD MURINO"

cumple con los requisitos necesarios para su titulación.



QBP GUADALUPE MORALES M.
ASESOR DE TESIS

EZA



Q. MA. TERESA ESTRADA ALVARADO
DIRECTOR DE LA ESCUELA
DE QUIMICA

UNIVERSIDAD " LA SALLE "

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Por medio de la presente hago constar que el presente trabajo presentado por Leticia Castellanos Palma de la carrera Química Farmacéutica Biológica ha sido concluido y revisado debidamente, quedando de manifiesto que el proyecto que lleva por título:

" Caracterización de péptidos de porina Omp C de *Salmonella typhi* que se unen a moléculas de clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad murino "

cumple con los requisitos de manera aceptable, otorgando con ello mi visto bueno.

ATENTAMENTE



QBP Guadalupe Morales.
Director de Tesis Interno.



Dr. Vianey F. Ortiz Navarrete.
Director de Tesis Externo.

ACUSE DE RECIBO DE EJEMPLARES DE TESIS EN LA BIBLIOTECA CENTRAL

NOMBRE DEL ALUMNO:

Castellanos Palma Leticia

NOMBRE DE LA TESIS O SEMINARIO:

*Caracterización peptídica de porinas. Camp. de Estructura y función
se ven a través de los datos. El análisis funcional de los componentes de la
membrana*

ESCUELA O UNIVERSIDAD

CARRERA

Universidad La Salle Químico Farmacéutico Biológico

FECHA

DIA

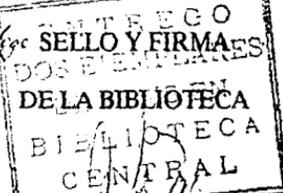
MES

AÑO

06

07

1995



- * FAVOR DE LLENAR POR TRIPPLICADO A MAQUINA O CON LETRA DE MOLDE
- * ENTREGAR DOS EJEMPLARES DE LA TESIS EN LA BIBLIOTECA CENTRAL U.N.A.M.
- * EXIGIR QUE LE SELLEN Y LE FIRMEN LAS DOS COPIAS

A Dios... por ser tan generoso conmigo.

Con profundo agradecimiento al Dr. Armando Isibasi por su apoyo y consejos.

**Al Dr. Vianney Ortiz con admiración y cariño por tenerme
paciencia y haberme brindado su valioso tiempo.**

**A mis Padres porque gracias a su gran amor pude llegar a
realizar una de mis metas.**

A Jaime y Yuri con muchísimo cariño y a una persona muy especial en mi vida ... Tere.

A mis amigos con especial respeto, agradecimiento y cariño

**A mis compañeros de laboratorio por su colaboración, consejos
y enseñanzas.**

ÍNDICE

	Página
Resúmen	1
Introducción	2
Objetivos	4
Generalidades	5
Complejo Principal de Histocompatibilidad.....	5
Distribución celular de las moléculas del CPH.....	6
Estructura y Función de las moléculas de clase I del CPH	
a) Características generales.....	6
b) Estructura terciaria.....	7
Características de los determinantes antigénicos presentados por moléculas de clase I.....	9
Generación de los péptidos que se presentan por moléculas de clase I: Vía endógena del procesamiento de antígeno	13
Papel del péptido en el ensamble y transporte a la superficie de las moléculas de clase	15
Moléculas de clase I vacías	16
Porina de Bacterias Gram-Negativas	
a) Estructura y función	18
b) Porina <i>Omp C</i> de <i>Salmonella typhi</i>	20
Propiedades inmunogénicas y papel en la inducción de protección	22
Materiales y Métodos	
Equipo	23
Reactivos	23
a) Para síntesis de péptidos en el sintetizador semiautomático <i>NovaSynGem</i>	23
b) Para síntesis de péptidos en el sintetizador automático <i>Applied Biosystems</i>	24
c) Inmunoensayo.....	24
Síntesis de péptidos en fase sólida	
a) Sintetizador semiautomático.....	25
b) Sintetizador automático	28
Purificación por HPLC	30

ÍNDICE

Materiales y Métodos

Ensayo de unión del péptido a moléculas de clase 31

Resultados

Regiones de la porina Omp C de *S. typhi* que
presentan los motivos para unirse a moléculas
de clase I del CPH 32

Síntesis de péptidos 33

Purificación de los péptidos sintéticos por HPLC 37

Ensayo de unión 41

Discusión de resultados 45

Conclusiones 47

Bibliografía 48

ABREVIATURAS

A	Amstrongs
β2m	Beta dos microglobulina
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CTL	Linfocitos T citotoxicos
DCM	Diclorometano
DMAP	Dimetilaminopirrolidina
DMF	Dimetilformamida
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fmoc	9-Fluoronilmetilcarbonilo
HOBT	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
IgG	Inmunoglobulina G
KD	Kilodaltones
LMP2	Subunidad del complejo enzimático proteasomal codificado en el CPH.
LMP7	Subunidad del complejo enzimático proteasomal codificado en el CPH.

ABREVIATURAS

mM	Milimolar
ml	Mililitros
Omp C	Porina Omp C de <i>Salmonella typhi</i> .
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos.
rpm	Revoluciones por minuto.
SFB	Suero Fetal Bovino.
TAP	Proteína transportadora de péptidos antigénicos.
TFA	Acido trifluoroacético.
UV	Luz Ultravioleta.

RESUMEN

La porina Omp C de *Salmonella typhi* ha demostrado ser inmunógeno al inducir una respuesta inmune celular y humoral en ratones y en humanos.; la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos (CD8+) no ha sido descrita. Este trabajo tiene como propósito el demostrar los determinantes antigénicos de la porina Omp C que tengan la capacidad de unirse a las moléculas de clase I ya sea del alelo K^b o D^b del complejo principal de histocompatibilidad. Para ello se eligieron tres regiones de la porina Omp C que en su secuencia presentan residuos característicos para unirse a las moléculas de clase I, estas regiones fueron la 73-80; la 132-139 para moléculas K^b y para moléculas D^b la región correspondiente fue la 314-321. Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida con derivados Fmoc y posteriormente purificados por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Una vez purificados los péptidos se sometieron a un ensayo de unión con la ayuda de la línea celular RMA-S. Este timoma murino al tener como característica la deficiencia en los transportadores de péptidos, presentan en su superficie moléculas de clase I inestables, y al incubarse con el péptido las moléculas se estabilizan y son reconocidas por anticuerpos conformacionales. La cuantificación de la unión entre las moléculas de clase I del CPH y los péptidos sintéticos se llevó a cabo por citometría de flujo teniéndose un resultado positivo para los tres péptidos seleccionados por lo tanto se proponen como potenciales epitopos para montar una respuesta inmune de tipo celular mediada por linfocitos T citotóxicos.

INTRODUCCION

El receptor para el antígeno de los linfocitos T citotóxicos (CD8) solamente interacciona con péptidos antigénicos cuando estos son presentados en el contexto de moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Los péptidos antigénicos presentados por las moléculas de clase I son octámeros o nonámeros que dentro de su secuencia conservan en posiciones fijas aminoácidos a los cuales se les denomina residuos de anclaje o residuos motivos, debido a que estos se acomodan en las hendiduras localizadas en la base del nicho para el péptido, que forman los dominios alfa1 y alfa2 de la cadena pesada de las moléculas de clase I del CPH. De tal manera que los residuos de anclaje tienen una estricta correspondencia con los diferentes alelos de las moléculas de clase I, por lo que una forma de predecir cuales regiones dentro de una proteína pudiesen ser epitopos reconocidos por linfocitos T CD8, es identificar a las secuencias de ocho o nueve aminoácidos que presenten motivos alelo específicos. Los péptidos candidatos pueden ser sintetizados químicamente y mediante un ensayo de unión en el que se emplea la célula de ratón RMA-S, la cual tiene en la membrana citoplásmica un elevado número de moléculas vacías de clase I, es posible determinar cual de los péptidos que se predijeron tiene la capacidad de ser presentado en el contexto de moléculas de clase I del CPH. Este ensayo de unión es particularmente útil cuando los péptidos van a ser presentados por moléculas de haplotipo H-2^b de ratón, es decir K^b, D^b ó L^b.

La porina OmpC de *Salmonella typhi* es una proteína de membrana externa que tiene la función de formar poros de difusión para solutos de peso molecular menor de 600 daltons. Esta proteína junto con otra porina, induce a ratones, un estado de protección contra el reto con la bacteria viva. Los mecanismos efectores de la respuesta inmune que evoca la inmunización con las porinas, son respuesta de anticuerpos de clase IgG y expansión clonal de linfocitos T CD4. Aún no está establecido si la inmunización con las porinas también estimulan respuesta de linfocitos T CD8; pero

debido a que la actividad citotóxica de esta subpoblación de linfocitos es muy importante en la respuesta inmune contra de infecciones virales e infecciones causada por bacterias intracelulares y como *Salmonella typhi* es una bacteria que se multiplica dentro de macrófagos, resulta muy importante identificar cual de las regiones de la porina OmpC se unen a moléculas de clase I del CPH, para posteriormente llegar a analizar la importancia de la respuesta de linfocitos T CD8 en el estado de protección inducido por las porinas.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar péptidos sintéticos de porinas de *Salmonella typhi* que por sus sitios de anclaje demuestren la capacidad de unirse a moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad murino.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Proponer secuencias de aminoácidos de la porina Omp C de *S. typhi* que reúnan los sitios característicos de anclaje para clase I propuestos por Rammensee.

- Sintetizar en fase sólida las secuencias de los péptidos seleccionados en un sintetizador de péptidos empleando derivados Fmoc y una columna o soporte sólido.

- Purificar por cromatografía líquida de alta resolución los péptidos sintetizados químicamente.

- Cuantificar la unión entre los péptidos sintéticos y las moléculas de clase I de la línea celular murina RMA-S.

GENERALIDADES

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El CPH (complejo principal de histocompatibilidad) codifica para tres familias de glicoproteínas conocidas como moléculas del CPH de clase I, clase II y clase III. Las moléculas clase I y clase II son también referidas como antígenos del CPH o aloantígenos, porque son reconocidos por el sistema inmune durante el rechazo de un tejido trasplantado entre individuos cuyo CPH es histoincompatible.

Las moléculas de clase I y clase II son expresadas principalmente como glicoproteínas transmembranales, mientras que los productos de los genes de clase III son moléculas solubles, en las que se incluyen algunos de los componentes del sistema de complemento(1,26).

Dentro del CPH también se encuentran algunos genes que codifican para moléculas que no se incluyen dentro de los grupos mencionados anteriormente, pero que también participan en la respuesta inmune, entre ellos se incluyen el factor de necrosis tumoral alfa y beta; los transportadores de péptidos antigénicos: Tap1 y Tap2 ; las subunidades LMP2 y LMP7 de la proteinasa de bajo peso molecular o proteasoma(1,26).

Una de las características importantes de las moléculas del CPH es su POLIMORFISMO, esto significa que en una misma población, de cada clase molecular y aún dentro de un locus existe un gran número de variantes (formas o alelos polimórficos), una segunda característica es que su expresión aumenta por la acción de interferon gamma (1,26)

DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS MOLECULAS DEL CPH

Las moléculas de clase I se expresan en casi todas las células somáticas nucleadas y el nivel de expresión varía enormemente entre los diferentes tipos de células. Así por ejemplo, las células musculares y las neuronas presentan un nivel bajo de expresión, mientras que los linfocitos expresan grandes niveles de moléculas de clase I. En contraste las moléculas de clase II únicamente se expresan en las células que participan en la fase de inducción de la respuesta inmune, por lo tanto las encontramos en la superficie de las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B (1,26).

El presente trabajo está directamente relacionado con las moléculas de clase I del CPH por lo tanto nos limitaremos a describir las características estructurales y funcionales las mismas.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MOLECULAS DE CLASE I DEL CPH

Características Generales.

Las moléculas de clase I son heterodímeros formados por una cadena pesada o alfa (Mr 45 KDa) asociada no covalentemente a una β 2 microglobulina (Mr 12 KDa). La cadena pesada es una proteína altamente polimórfica producto de los genes de clase I del CPH, en los ratones son las moléculas K, D y L y en humanos son las moléculas HLA-A, B y C (1,26).

La cadena pesada es una cadena polipeptídica transmembranal que puede ser dividida estructuralmente en 5 distintas regiones. Tres expuestas hacia el medio extracelular conocidos como dominios alfa 1, alfa 2 y alfa 3; una región transmembranal y una región citoplasmática. Los tres dominios extracelulares son de aproximadamente 90 aminoácidos cada uno; el alfa 1 y alfa 2 son muy polimórficos mientras que el alfa 3 es muy conservado entre todas las moléculas de clase I además tanto el alfa 2 como el alfa 3

tiene un enlace disulfuro intradominio. La región transmembranal de todas las moléculas de clase I contiene una secuencia hidrofóbica de aproximadamente de 25 aminoácidos que se expande en la bicapa lipídica. Esta región termina con una secuencia de cinco aminoácidos básicos, incluyendo los residuos Arginina (R) y Lisina (K) que se cree son importantes para anclar el polipéptido en la membrana plasmática (una secuencia similar de aminoácidos básicos ha sido encontrada en otras glicoproteínas transmembranales). La región citoplasmática tiene aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, de entre los cuales los únicos aminoácidos que se conservan, son aquellos que forman secuencias consenso para la fosforilación por acción de proteínas cinasas A o bien por tirosina cinasas, es decir residuos de serina, tirosina o treonina. Por otro lado la fracción de carbohidratos de las moléculas de clase I, tanto en el ratón como en el humano, se une mediante N-glicosilación en el residuo 86 aunque algunos alelos de ratón presentan otros dos sitios de N-glicosilación en los residuos 176 y 256 (1,26)(Fig 1).

Estructura Terciaria

En 1987 Bjorkman y cols. describieron la primera estructura tridimensional de la molécula de clase I del CPH. A partir de una línea celular de un linfoblasto de B, tratada con la proteasa papaína, se obtuvo un fragmento soluble de 271 aminoácidos, que contenía los dominios alfa 1,2,3 y la beta 2 microglobulina. Los cristales preparados con este fragmento fueron analizados por rayos X a una resolución de 3.5 Å. Recientemente se han descrito las estructuras de las moléculas HLA-Aw68, HLA-B27 y K^b las cuales fueron analizadas a una resolución de 2.4 Å (35,8,2,9).

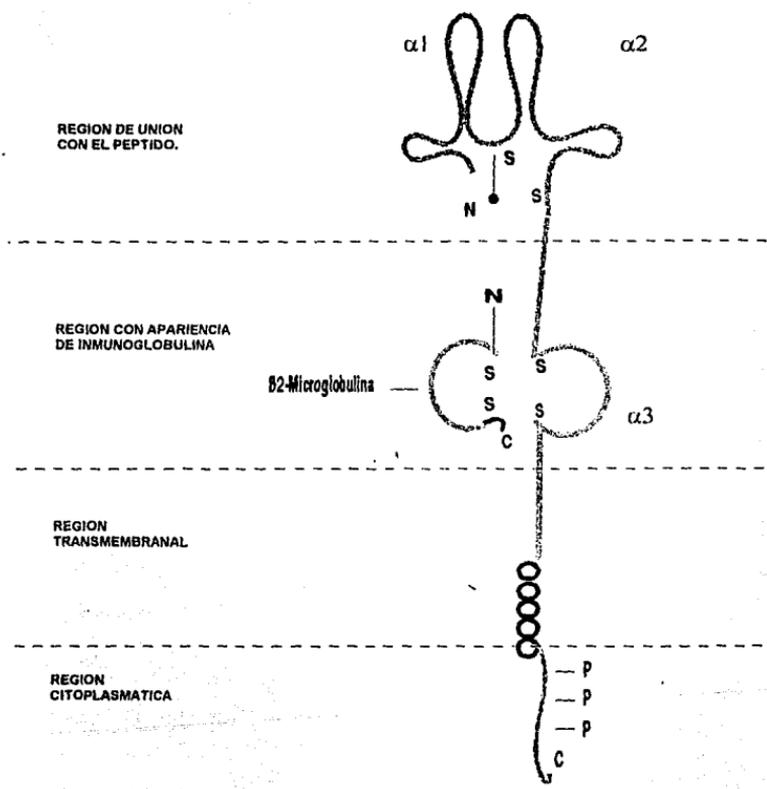


Fig 1 Diagrama esquemático de la molécula de clase I

La estructura tridimensional consiste de una región distal a la membrana constituida de los dominios alfa 1 y alfa 2 de la cadena pesada y de una región proximal a la membrana compuesta del dominio alfa 3 de la cadena pesada y de la β -2 microglobulina. La estructura secundaria de cada dominio de la parte distal, es de cuatro tiras beta plegadas antiparalelas y una alfa hélice localizada del lado carboxilo terminal de cada hoja beta. De tal manera que la conformación de la parte distal es el de una estructura en forma de nido, con dimensiones de 30 Å X 10 Å, el cual consiste de una plataforma de hojas beta plegadas flanqueada de dos alfa helices. Y es dentro de este nicho donde se unen los determinantes antigénicos (péptidos) que van a ser presentados por las moléculas de clase I a los linfocitos T citotóxicos. La estructura de la región proximal a la membrana (dominio alfa 3 y β -2 microglobulina) guarda una similitud con un dominio constante de una inmunoglobulina, es decir esta compuesta por dos hojas β plegadas, una de ellas formada de cuatro tiras beta plegadas antiparalelas y la otra de tres (30). Estas estructuras interaccionan con la plataforma formada por los dominios alfa 1 y alfa 2, contribuyendo con ello a la estabilidad de las moléculas(35,8,2,9)(Fig 2).

Características de los Determinantes Antigénicos Presentados por Moléculas de clase I.

Como se mencionó anteriormente la función de las moléculas de clase I es la de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T citotóxicos. Un gran avance en el entendimiento de la función de las moléculas del CPH ha sido aportado por el desarrollo de los métodos que permiten establecer la secuencia, el tamaño y el origen de los péptidos que se unen a esas moléculas. Así mismo ha sido posible conocer mejor el papel que juega el polimorfismo alélico de las moléculas de clase I en la selección de los péptidos antigénicos (7).

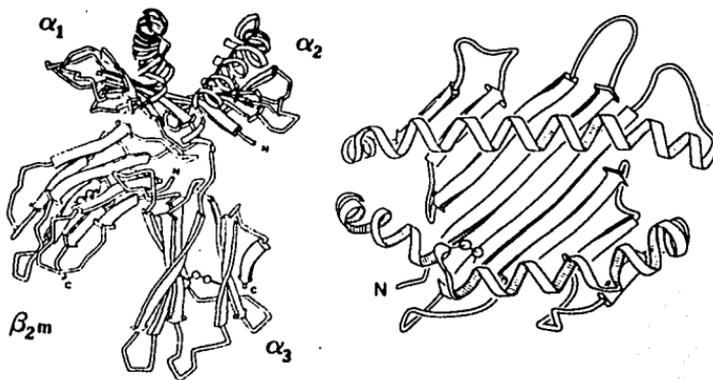


Fig 2 Estructura terciaria de la molécula de clase I del CPH.

Los métodos utilizados para conocer las características de los péptidos unidos a las moléculas de clase I incluyen en primer termino la purificación de la molécula mediante un inmunoabsorbente (empleando anticuerpos monoclonales alelos específicos). El siguiente paso es la desnaturalización de las moléculas purificadas por ebullición a pH de 2, lo que permite el desprendimiento de los péptidos, posteriormente el material de bajo peso molecular se recupera por filtración y la mezcla de péptidos se separa por cromatografía en fase reversa empleando una columna C18 en un cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC). Finalmente se procede a la microsecuenciación de cada una de las fracciones obtenidas de la HPLC. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente Rammensee y cols encontraron: 1) que dependiendo del alelo los péptidos pueden ser de 8 ó 9 aminoácidos, 2) que dentro de la secuencia esos octámeros o nonámeros dos residuos se conservan, 3) que esos dos residuos conservados, a los que se les ha denominado residuos de anclaje ó motivos alelo específicos, también conservan su posición 4) que la mayoría de los péptidos identificados provienen de proteínas citosólicas endógenas. En el siguiente cuadro se muestran algunos ejemplos de los motivos alelo-específicos para moléculas de ratón y humanas: (11,14,29,30).

CUADRO I

Motivos Alelo-Específicos de los Péptidos Presentado por Moléculas de Clase I del CPH

ALELO	1 2 3 4 5 6 7 8 9	ORIGEN
Kb	R G Y V Y Q G L A P G N Y P A L S I I N F E K L	NP VSV 52-59 NP VS 321-332 OVA 258-276
Db	A S N E N M E T M S G P S N T P P E I C K G V N K E Y L	NP INF 366-374 Adv E1A 234-243 TAg SV40 223-231
Kd	T Y Q R T R A L V S Y F P E I T H I I Y A T V A G S L	NP INF 147-154 Mastocitoma P815 HA INF 523-549
Dd	R G P G R A F V T I G P P H S N N F G Y V G P Q K N E N L	gp160 HIV Ag Tum P35B 4-13 desconocido
HLA-A2.1	L L D V P T A A V S L L P A I V E L Y L L P A I V H I	secuencia señal IP30 fosofatasa A2 ARN helicasa
HLA-B27	R R I K E I V K K G R I D K P I L K S R Y W A I R T R	Hsp 89 proteína ribosomal NP INF 383-391

Current Opinion in Immunology 1994.

Generación de los Péptidos que se Presentan por Moléculas de Clase I: Vía Endógena de Procesamiento de Antígeno.

Como se menciona anteriormente los determinantes antigénicos que se presentan en el contexto de moléculas de clase I, son péptidos que provienen de proteínas las cuales son degradadas en el citosol (procesamiento de antígeno) de la célula presentadora de antígeno (CPA); por lo tanto a estos antígenos se les conoce como antígenos endógenos, entre estos se incluyen antígenos virales, antígenos tumorales así como a todas las proteínas citosólicas propias de la CPA. También pueden ser presentados en el contexto de moléculas de clase I antígenos que no son sintetizados por la CPA, como es el caso de péptidos de bacterias o parásitos que se multiplican intracelularmente en el citosol de la CPA (20).

Se ha propuesto que el complejo multicatalítico proteasoma, es la proteasa encargada de degradar los antígenos endógenos; esta hipótesis se basa en el hecho de que los proteasomas, son la proteasa más abundante del citosol (28) y en que dos de las subunidades, LMP2 y LMP7, de las 20 diferentes que la constituyen, están codificadas dentro del CPH (19). Los péptidos generados en el citosol son translocados al lumen del retículo endoplásmico, por un proceso dependiente de energía y que lleva a cabo una bomba formada por las subunidades Tap1 y Tap2 (transportadores de péptidos antigénicos). Es importante hacer notar que ambos Taps pertenecen a la familia de los ABC-transportadores, que son proteínas polimórficas y los genes que les codifican están localizados contiguos a los genes que codifican para las dos subunidades de los proteasomas dentro del CPH (5,9,18,23,27,31,32) (Fig 3).

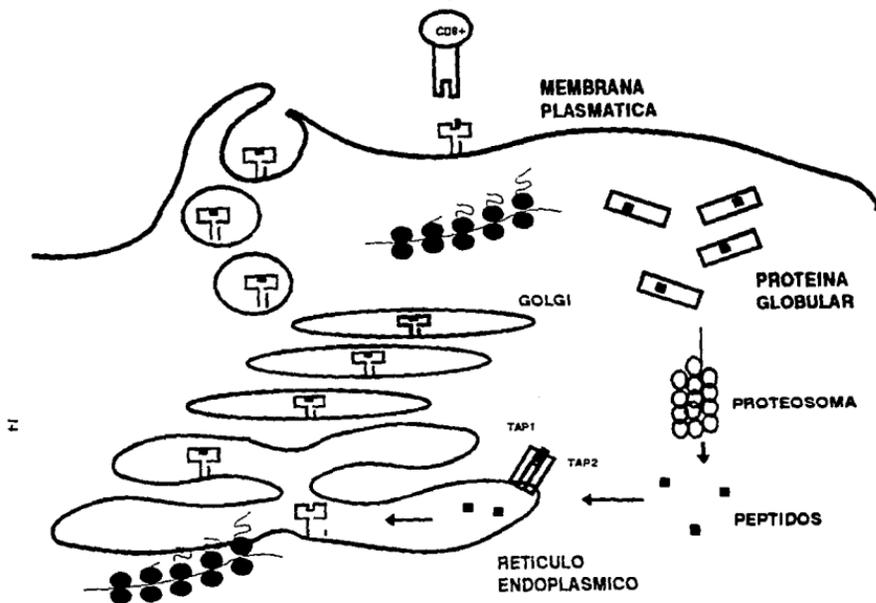


Fig 3 Vía de presentación de antígeno endógeno por clase I

La degradación en el citosol aporta la mayoría del repertorio de los péptidos que se unen a las moléculas de clase I. Otra pequeña proporción de ese repertorio de péptidos proviene las proteínas no funcionales que son degradadas en el lumen del retículo endoplásmico (RE), así como también de las secuencia señal, para el translocamiento de proteínas al lumen del RE, las cuales son péptidos hidrofóbicos de entre 10 a 14 aminoácidos (34).

Papel del Péptido en el Ensamble y Transporte a la Superficie de las Moléculas de Clase I.

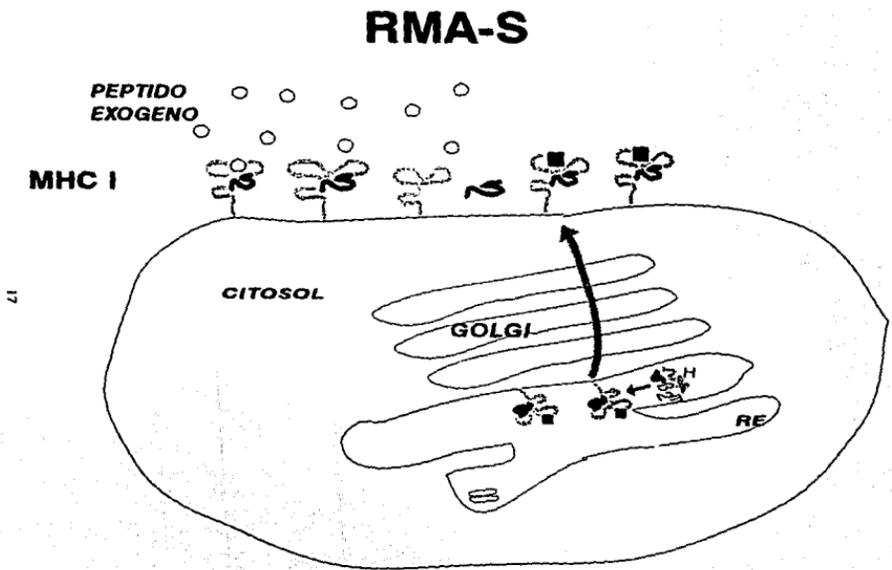
Tanto la cadena pesada como la β -2 microglobulina son proteínas que inmediatamente después de su síntesis son translocadas al lumen del RE. La unión entre la cadena pesada y la β -2m ocurre dentro de los primeros cinco minutos después de su síntesis, posteriormente ese dímero se asocia con los Taps lo que le permite recibir eficientemente los péptidos del citosol que son translocados al lumen del RE por dicha bomba. Una vez que el péptido se une al nicho formando por los dominios alfa1 y alfa2 de la cadena pesada, ocurren cambios conformacionales en la cadena pesada los que promueven la liberación de la molécula de clase I de los Taps así como el transporte del complejo trimolecular cadena pesada-péptido- β -2-microglobulina hacia la superficie de célula a través de complejo de Golgi (6,33).

Por lo descrito en el párrafo anterior se pone de manifiesto la importancia del péptido en la expresión funcional de moléculas de clase I. Dicha función se ha quedado establecida de dos maneras diferentes, por la existencia de líneas celulares, humanas y de ratón, deficientes en uno o ambos Taps y por la descripción, en dos mujeres, de una inmunodeficiencia, donde las pacientes presentaban infecciones bacterianas recurrentes, sin tener alterados los niveles de inmunoglobulinas, ni el número de linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8. El única alteración detectada fué la disminución de moléculas de clase I en la superficie de células de sangre periférica debido a la falta de expresión de Tap2 .

Moléculas de Clase I vacías.

Las líneas celulares deficientes en Taps permitieron describir un tipo particular de moléculas de clase I, las cuales fueron denominadas moléculas vacías debido a que no llevan unido péptidos antigénicos, por lo tanto son inestables en la superficie celular (17). La hipótesis más aceptada para explicar la presencia de moléculas vacías de clase I en la membrana plasmática es que péptidos antigénicos subóptimos (probablemente sin los motivos de anclaje o sin el tamaño adecuado) promueven el ensamble intracelular y el transporte de ellas pero una vez que arriban a la superficie pierden el péptido subóptimo, la β -2microglobulina y solamente es posible detectar la cadena pesada, sin conformación, con anticuerpos dirigidos contra una secuencia citosólica de la molécula (22). Este tipo de moléculas fueron descritas originalmente en la línea celular denominada RMA-S, la cual se produjo por mutación química del timona de ratón RBL-5 pero también se les encuentra en todo tipo de células que expresan moléculas de clase I (15).

La cadena pesada sin conformación y la molécula vacía no parecen tener una función en la activación de linfocitos T CD8 sino más bien en la captación de péptidos que provienen del medio extracelular, así por ejemplo la línea RMA-S, que en condiciones de cultivo normales no expresa en su superficie moléculas de clase I (Kb y Db) estables, es posible reestablecer su expresión mediante la adición, en el medio de cultivo, de péptidos que reúnan las características para unirse a los mencionados alelos (Fig 4). Esta característica de cambiar la estructura conformacional de las moléculas vacías está siendo utilizada como método para predecir cuales regiones de una proteína pudiesen ser determinantes antigénicos reconocidos por linfocitos T CD8 (16,24).



17

Fig 4 Célula RMA-S con alimentación exógena de péptidos sintéticos

PORINA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Estructura y Función de las Porinas

Las porinas son proteínas transmembranales de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas, que se les asigna ese nombre por su propiedad de formar poros de difusión para solutos de peso molecular menor de 600 daltons. Son proteínas que se expresan abundantemente en forma de homotrimeros en la membrana externa, el peso molecular de las unidades monoméricas van de 36 Kd a 42 Kd, su expresión esta regulada principalmente por osmolaridad y temperatura, se expresan diferentes tipos de ellas en una misma bacteria las cuales presentan una alta homología entre sus secuencias de aminoácidos por lo que se piensa que provienen de un gene ancestral común. A continuación se enlistan las porinas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella typhi* (21).

Escherichia coli: OmpC, OmpF, PhoE

Salmonella typhimurium: OmpC, OmpF, OmpD, PhoE.

Salmonella typhi: OmpC, Omp F1

La estructura conformacional de las porinas se conoce en base de la estructura de la porina OmpF de *Escherichia coli* que es la única cristalizada a la fecha, ello nos permite saber que estas proteínas tienen una estructura secundaria de 16 hojas beta-plegadas antiparalelas las cuales están unidas entre sí a través de 7 asas cortas (de 2 a 5 aminoácidos) orientadas hacia el espacio periplásmico y 8 asas largas (de 5 a 44 residuos, 14 en promedio) expuestas hacia el medio extracelular. La proteína se enrolla de tal forma que el residuo amino terminal y el residuo carboxilo terminal interactúan entre sí mediante un enlace iónico, el resultado final es una estructura en forma de un barril o un cilindro cuyo centro es el poro de difusión (Fig 5). El diámetro del poro varía entre 1.2 a 1.6 Å y tiene cierta selectividad de acuerdo a cada porina, así OmpC y OmpF tienen selectividad por solutos neutros y cationes mientras que PhoE por aniones (4).

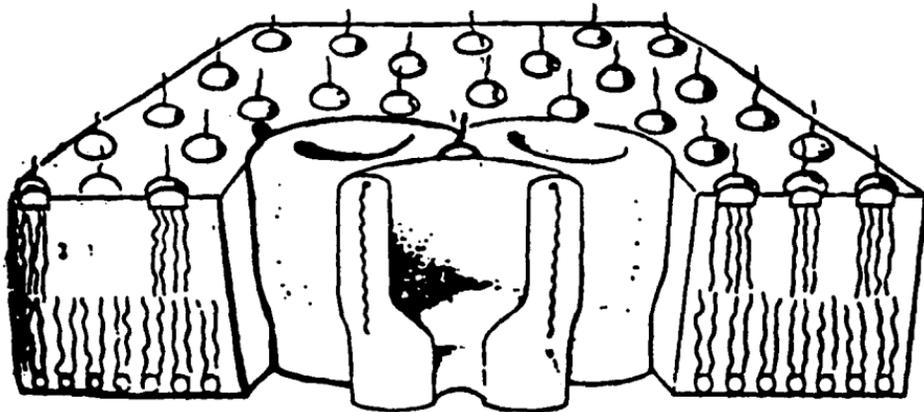


Fig 5 Estructura tridimensional de las porinas

Modelo propuesto por JAP para la porina Pho E (1989). Cristalografía electrónica con una resolución de 18 Å (13).

Otra función de las porinas es servir de receptores para fagos y colicinas, en este caso también existe cierta selectividad en cada porina, por ejemplo a la OmpF de *Escherichia coli* se le unen los fagos Tula, TP1, TP2, TP5 y la colicina ColA; a la OmpF de *Salmonella typhimurium* no está determinado cuáles fagos y colicinas se le unen; a la OmpC de *Escherichia coli* se le unen los fagos Tulb, PA2, 434, 551 TP2, TP5, TP6 y a la OmpC de *Salmonella typhimurium* se le unen los fagos PH42, PH105 y PH201.

Porina OmpC de *Salmonella typhi*.

La porina OmpC de *Salmonella typhi* tiene 378 aminoácidos como proteína inmadura y 357 la proteína madura. Tiene un 83% de homología con la Omp C de *Escherichia coli* y de un 85% con la *Salmonella typhimurium*, así como un 80% con la Omp F de *Escherichia coli*, lo que permite suponer que sus estructuras conformacionales son muy semejantes; en este sentido mediante el empleo de diferentes programas de predicción de estructura secundaria han permitido predecir la probable estructura de la OmpC es muy semejante a la de Omp F de *Escherichia coli*, es decir 16 hojas beta plegadas con 8 asas orientadas hacia el espacio periplásmico y 8 asas expuestas hacia el medio extracelular (Fig 6). Resultados experimentales recientes apoyan dicha propuesta pues se ha demostrado que las regiones correspondientes a las asas 7 y 8 efectivamente están expuestas sobre la superficie de la bacteria ya que son accesibles a anticuerpos contra esas regiones (25).

La actividad funcional de la porina Omp C de *Salmonella typhi* no ha sido estudiada en detalle por lo que no se conoce la selectividad del poro, pero dado a la semejanza con la OmpC de *Escherichia coli* como de *Salmonella typhimurium* se considera que también tiene selectividad por solutos neutros y por cationes; tampoco se conoce cuáles son los fagos y colicinas que se unen a ella.

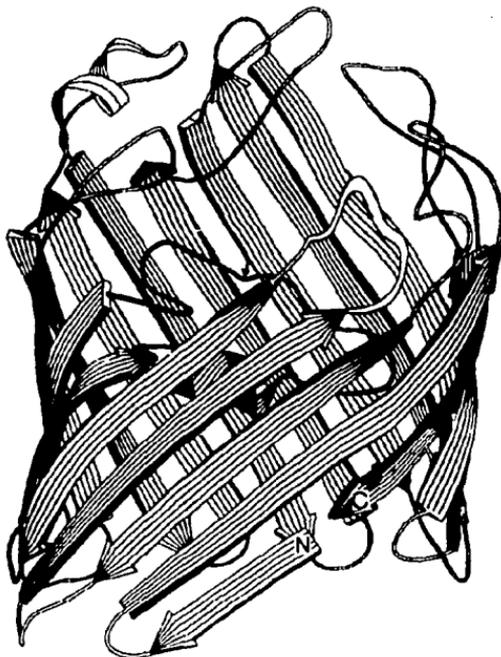


Fig 6 Estructura tridimensional de la porina Omp F de
Escherichia coli

Propiedades Inmunogenicas y Papel en la Inducción de Protección:

Ratones inmunizados ya sea con *Salmonella typhi* viva o muerta, o con una mezcla de 10 a 15 PMEs (donde la OmpC representa menos del 1 % del total de la concentración de proteína), o con una mezcla de OmpC y otra porina aún no identificada (relación 1:1 del contenido de proteína), presentan títulos altos de anticuerpos IgG específicos contra OmpC; así como también respuesta de linfocitos T. En humanos sanos no se detecta respuesta de anticuerpos de clase IgG contra la Omp C, ni repuesta proliferativa de linfocitos T, ambos tipos de respuesta inmune solamente aparece en individuos en fase de convalescencia de fiebre tifoidea o en individuos que fueron vacunados con la vacuna oral contra fiebre tifoidea pero no en los inmunizados con la vacuna elaborada con la bacteria muerta por calor. Estos resultados indican que la OmpC es una proteína muy inmunogenica por lo que se considera como un buen candidato para la elaboración de una vacuna contra la fiebre tifoidea (3).

La inmunización con cantidades tan bajas como 5 mg de dos porina (Omp C y otra aún no identificada) a inducen protección del 100%, a ratones, contra el desafío hasta de 1000 DL50 (dosis letales al 50%) de *Salmonella typhi* y protección del 40% contra el reto con *Salmonella typhimurium*; sin embargo la administración de la OmpC recombinante solamente induce protección del 50% contra el reto con *Salmonella typhi*, lo que señala la importancia de las dos porinas para el establecimiento de inmunidad protectora (12). Esta protección puede ser transferida por anticuerpos policlonales o monoclonales contra de ambas porinas (10) y la respuesta proliferativa de linfocitos T en los ratones inmunizados con las porinas indican la participación de la respuesta inmune celular en los mecanismos de protección aunque a la fecha no esta definido si los linfocitos T CD4 o los linfocitos T CD8 o ambas poblaciones son indispensables para la inducción de la protección observada.

MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPO

Sintetizador de péptidos semiautomático NovaSyn Gem
Sintetizador de péptidos automático Applied Biosystems
modelo 432A
Liofilizadora LABCONCO
Centrífuga Damon IEC PR-J
Rota vapor SCHNELLHEBER
Bomba de vacío Millipore
Centrífuga DAMON IEC-PR-J
Cromatógrafo para líquidos de alta resolución Waters
modelo 600 E
Detector de UV y Visible de longitud de onda variable
modelo 486
Columna preparativa de fase reversa Waters Bondapak
125 A 7.8 x 300 mm
Campana de flujo laminar VECO
Incubadora con alimentación de CO₂ FORMA SCIENTIFIC
Espectro Beckman DU-64
Facscan BECKTON DICKENSON
Impresora personal Hewlett-Packard ThinkJet

REACTIVOS

Para síntesis de péptidos en el sintetizador semiautomático
NovaSyn Gem:

Resina K_A polidietilacrilamida macrosorb
Aminoácidos protegidos con el grupo Fmoc Novabiochem
Piperidina SIGMA
Dimetilformamida BECKMAN
Dimetilaminopirrolidina Novabiochem
1-hidroxibenzotriazol Novabiochem
Acido trifluoroacético SIGMA

Para síntesis de péptidos en el sintetizador automático Applied Biosystems:

Columnas para síntesis de péptidos Synergy

Columnas de aminoácidos Synergy

Dimetilformamida Applied Biosystems

Tetrahidrofurano Applied Biosystems

**N,N Diisopropiletilamina / dimetilsulfoxido / N-metilpirrolidona
Applied Biosystems**

2-(1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-

tetrametiluniumhexafluorofosfato, 8mmol. Applied Biosystems

Inmunoensayo:

RPMI GIBCO BRL

Yoduro de propidio SIGMA

**Segundo anticuerpo: IgG de cabra anti ratón conjugada a
isotiocianato de fluoresceína GIBCO BRL**

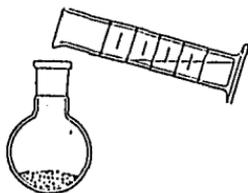
SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

La síntesis de los péptidos se realizó en dos sintetizadores diferentes, el primero en ser empleado fue el sintetizador semiautomático NovaSyn Gem y el segundo fue el sintetizador automático Applied Biosystems . A continuación se describe el primer procedimiento de síntesis el cual consistió en a) acoplar el primer aminoácido a la resina y b) el acoplamiento de los aminoácidos restantes.

I. SINTETIZADOR SEMIAUTOMÁTICO

A) UNIÓN DEL PRIMER AMINOÁCIDO A LA RESINA

- 1.- Se colocó un gramo de la resina en un matraz seco y limpio
- 2.- Se agregó DMF hasta cubrir la resina y se agitó el matraz cada cinco minutos durante media hora
- 3.- Se decantó el DMF y se repitió el paso anterior.

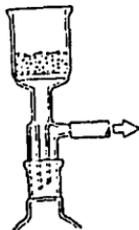


- 4.- Por otra parte se disolvió de 0.25 a 0.5 mmoles del primer aminoácido en un mililitro de DMF y se añadió al matraz que contiene la resina pretratada y después se le agregó de 0.5 a 1.0 mmoles de DMAP disuelto en 0.5 ml de DMF
- 5.- Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante hora y media y se agitó cada 15 minutos.



6.- La resina fue filtrada al vacío y lavada secuencialmente con DMF, alcohol amílico, ácido acético, alcohol amílico y por último éter etílico frío.

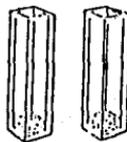
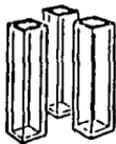
7.- La resina se secó al vacío hasta que tomó la consistencia inicial.



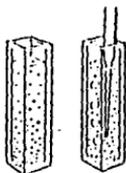
ESTIMACIÓN DEL GRADO DE UNIÓN DEL PRIMER RESIDUO DETERMINANDO LA LIBERACIÓN DEL GRUPO FMOC

1.- Se tomaron dos celdas de cuarzo 3 x 10 mm y se ajustó la longitud de onda del espectrofotometro a 300 nm

2.- Se pesaron 10 mg de la resina acoplada con el primer aminoácido y se añadieron 3 ml de piperidina al 20 % en DMF en cada una de las celdas.



3.- Se agitó la mezcla suavemente con ayuda de una pipeta Pasteur de capilar ancho durante 2 o 3 minutos. Se dejó que la resina se sedimentara y se leyó la absorbancia. La estimación de unión se obtiene por medio de una gráfica de correlación (proporcionada por el proveedor) y si el valor obtenido es menor del 70 % es necesario repetir el procedimiento de acoplamiento para el primer residuo.

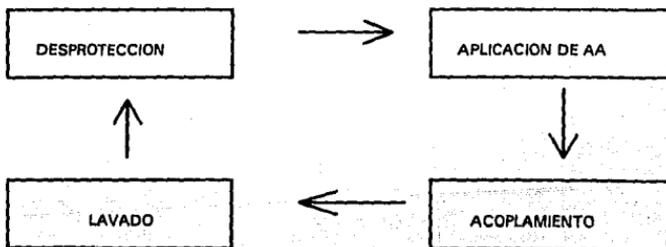


B) SÍNTESIS DEL PÉPTIDO

Para continuar la síntesis la resina previamente tratada con DMF durante 5 minutos se empacó en una columna de vidrio y se conectó al sintetizador semiautomático.

CICLOS DE SÍNTESIS

Los ciclos de síntesis se llevaron a cabo de la siguiente manera y de acuerdo al esquema.



DESPROTECCIÓN del grupo amino, consistió en pasar a través de la columna, piperidina al 20 % en DMF por un periodo de 10 minutos . Esta desprotección fue monitoreada mediante la lectura de la absorbancia a 300 nm y utilizando como blanco piperidina al 20 % en DMF.

APLICACIÓN del siguiente aminoácido . El aminoácido fue disuelto en 0.5 ml de DMF, mientras que por otra parte también se disolvió el catalizador HOBT en 0.3 ml y ambas soluciones fueron depositadas en el inyector.

ACOPLAMIENTO del aminoácido, para ello el sintetizador recircula por el sistema la solución anterior durante dos horas.

LAVADO este proceso implicó la recirculación de DMF por la columna empacada con el fin de retirar el exceso de aminoácido no acoplado después se deposita una cantidad de 3 ml de DMF que también para quitar residuos del aminoácido anterior. Al concluir la inyección se volvió a activar el lavado durante 5 minutos. Por lo que se procedió a la desprotección del aminoácido acoplado y el ciclo se repitió hasta lograr la secuencia deseada.

II. SINTETIZADOR AUTOMATICO

La síntesis realizada en el sintetizador automático de Applied Biosystems basicamente sigue los mismos principios que el anterior .

Las reacciones que se llevan a cabo para la unión de cada aminoácido son: desprotección, activación y acoplamiento.

Durante la desprotección, el grupo protector es removido para hacer reaccionar el grupo amino del aminoácido acoplado a la resina con el aminoácido activado.

La activación prepara al siguiente aminoácido que va a ser unido a la cadena.

El acoplamiento ocurre cuando las formas activas del aminoácido, se unen con el grupo amino del aminoácido desprotegido en el péptido.

En cada ciclo de la síntesis el grupo Fmoc es removido con piperidina en DMF, generándose una sal de carbamato la cual

puede ser detectada por el monitoreo de la conductancia. El rango en el que la reacción de desprotección ocurre sirvió como indicador de la reactividad de la resina con el péptido. Una reacción rápida dió un pico definido y angosto en cambio una reacción lenta dió un pico más ancho.

DESPRENDIMIENTO DE LA CADENA PEPTÍDICA

a) Para péptidos obtenidos en el sintetizador semiautomático.

Dicha técnica se realiza mediante la filtración de la resina y la disolución del péptido en TFA.

La resina que tiene unido el péptido recién sintetizado se depositó en un matraz y se le agregó 8 ml. de TFA dejándose en agitación durante 2.5 a 3 hrs.

Al concluir este periodo, el péptido disuelto en TFA es recuperado al filtrar la dilución por un embudo buchner de poro mediano

La solución anterior se sometió a evaporación hasta obtener un volumen aproximado de 2 ml. A esta solución se le añadió posteriormente 50 ml de éter frío.

El péptido precipitado en éter es filtrado por un embudo de poro fino y secado en un desecador con vacío durante 4 hrs.

Una vez seco, el péptido es disuelto ya sea en ácido o en base según sea su punto isoeléctrico.

b) Para péptidos obtenidos en el sintetizador automático.

La resina que contiene el péptido fue tratada con 8 ml de TFA y fue puesta en agitación durante 2 hrs, una vez que terminó el tiempo toda la solución fue filtrada al vacío por un embudo de poro mediano y fue enjuagado con 2 ml. de DMC después se evapora hasta obtener un volumen aproximado de 2ml.

Se precipitó el péptido concentrado con 50 ml de éter y el péptido fue recuperado por filtración al vacío por un embudo buchner de poro fino, y fue secado en un desecador con vacío y fue disuelto en 20 ml de ácido acético al 50 % para su posterior liofilización.

PURIFICACIÓN POR HPLC

La purificación del péptido se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters empleándose una columna de fase reversa y un gradiente lineal con una solución de TFA 0.1% en agua (disolvente A) y TFA 0.1 % en acetonitrilo (disolvente B).

Las condiciones del equipo fueron las siguientes:

Flujo: 2 ml/min

Sensibilidad: 2.00

Absorbancia: 220 nm

Cantidad de muestra: 50-300 μ l

SISTEMA DE GRADIENTE

TIEMPO (min)	% A	% B
0	100	0
1	100	0
26	40	60
31	40	60
32		0

Las fracciones que contengan al péptido, (las de mayor absorbancia) fueron recolectadas y liofilizadas. El producto obtenido fue empleado para los ensayos de unión.

ENSAYO DE UNIÓN DEL PÉPTIDO A MOLÉCULAS DE CLASE I

El ensayo de unión entre el péptido sintético y las moléculas de clase I se realizó incubando éste con la línea celular RMA-S. El procedimiento fue el siguiente:

En una placa de 96 pozos de fondo redondo se depositan de 200,000 a 300,000 células y se les agregó el péptido en solución en una concentración de 50 mM, la placa fue incubada durante 18 hrs a 37° C con un 5 % de CO₂.

Transcurrido el tiempo, la placa se centrifuga durante un minuto a 1500 rpm, se retira el sobrenadante y el botón celular se resuspende con 100µl de sobrenadante de hibridoma que contiene anticuerpos antimoléculas de clase I dejando que la reacción continúe durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C.

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales K10.56 y Y-3 para la identificación del haplotipo K^b, mientras que para las moléculas D^b se emplearon los anticuerpos B22-249 y el 28-14-8 y como control negativo se utilizó el anticuerpo 11.4.1 el cual es específico para la molécula K^k, dichos anticuerpos fueron donados por el Prof. Günter Hämmerling del Instituto de Inmunología y Genética del Centro Alemán de Investigaciones Oncológicas.

Posteriormente la placa se centrifugo y el paquete celular se lavo con 200µl de PBS 2% SFB.

El paquete celular fue incubado en 50 µl del segundo anticuerpo durante 30 minutos a una temperatura de 4°C después se centrifuga a 1500 rpm durante un minuto para quitar el exceso y las células fueron lavadas dos veces como se describió anteriormente.

Por último las células fueron resuspendidas en 300 µl de yoduro de propidio al 0.1 % en PBS y manteniéndolas a 4°C hasta en momento de medir la intensidad de fluorescencia por medio de citometría de flujo.

TABLA I
REGIONES DE LA PORINA OMP C DE *Salmonella typhi* QUE
PRESENTAN LOS MOTIVOS PARA UNIRSE A MOLECULAS
DE CLASE I DEL CPH

32

	<u>Para Kb</u>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
RESIDUOS DOMINANTES					Y			L	
SECUENCIA 73-80	T	R	V	A	F	A	G	L	
SECUENCIA 132-139	R	N	T	A	F	F	G	L	
RESIDUOS ALTERNOS			Y					M	
SECUENCIA 314-321	T	Y	Y	F	N	K	N	M	
	<u>Para Db</u>								
RESIDUOS DOMINANTES						N			M
RESIDUOS ALTERNOS					V	V			
SECUENCIA 266-274	F	E	V	V	A	Q	Y	Q	F

RESULTADOS

I. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

A continuación se muestra la hoja de control de la síntesis de péptidos del sintetizador semiautomático Novabiochem, en esta hoja se sigue el procedimiento de la síntesis del péptido de ovoalbúmina el cual fue empleado como testigo positivo, también nos muestra cuales son los aminoácidos que integran dicha secuencia y su rendimiento.

1.- Secuencia: OVOALBUMINA 258-266 SIINF EKL

Porcentaje de unión del primer aminoácido: 100%

Rendimiento: 23.6 mg

CONTROL DE SÍNTESIS QUÍMICA DE PEPTIDOS

Fecha 22-Ene-93 Operador _____
Resina K4-05 g.

OPERACION	min	AMINOACIDO					
		L	K	E	F	N	T
LAVADO	5	/	/	/	/	/	/
CARGA		/	/	/	/	/	/
RECICLAJE	1:30	/	/	/	/	/	/
LAVAR INYEC		/	/	/	/	/	/
RECICLAJE		/	/	/	/	/	/
PRUEBA		/	/	/	/	/	/
LAVADO	5	/	/	/	/	/	/
CARGA DMF		/	/	/	/	/	/
LAVADO		/	/	/	/	/	/
PIPERIDINA	30	/	/	/	/	/	/
LAVADO	5	/	/	/	/	/	/

OPERACION	min	AMINOACIDO					
		F	S				
LAVADO	5	/	/				
CARGA		/	/				
RECICLAJE	1:30	/	/				
LAVAR INYEC		/	/				
RECICLAJE		/	/				
PRUEBA		/	/				
LAVADO	5	/	/				
CARGA DMF		/	/				
LAVADO	30	/	/				
PIPERIDINA		/	/				
LAVADO	5	/	/				

La siguiente figura muestra la tabla de control de síntesis del péptido 132-139 de la porina Omp C, el control lleva el orden y el tiempo con el que el sintetizador semiautomático va realizando los pasos de desprotección con piperidina, acoplamiento y lavado. En la parte superior de la hoja se describen tanto la secuencia de aminoácidos como el rendimiento.

- 2.- Secuencia: OMP C 132-139 RNTDFFGL
 Porcentaje de unión del primer aminoácido: 100 %
 Rendimiento: 11.4 mg

CONTROL DE SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS

Fecha 18 Feb 83 Operador _____
 Resina 64.05 g.

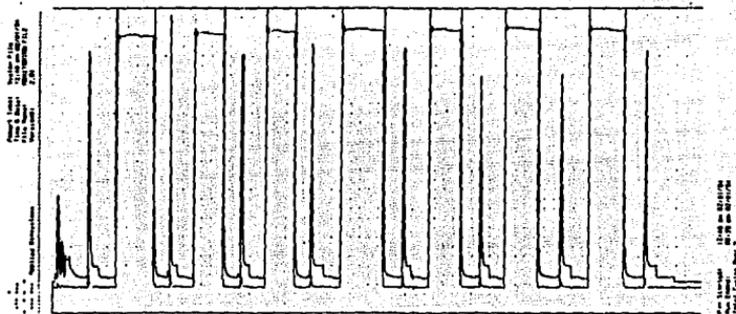
OPERACION	min	AMINOACIDO					
		L	G	F	F	G	L
LAVADO	5	/	/	/	/	/	/
CARGA		/	/	/	/	/	/
RECICLAJE	1:30	/	/	/	/	/	/
LAVAR INYEC		/	/	/	/	/	/
RECICLAJE							
PRUEBA							
LAVADO	5	/	/	/	/	/	/
CARGA DMF		/	/	/	/	/	/
LAVADO		/	/	/	/	/	/
PIPERIDINA	30	/	/	/	/	/	/
LAVADO	5	/	/	/	/	/	/

OPERACION	min	AMINOACIDO					
		N	R				
LAVADO	5	/	/				
CARGA		/	/				
RECICLAJE	1:30	/	/				
LAVAR INYEC		/	/				
RECICLAJE							
PRUEBA							
LAVADO	5	/	/				
CARGA DMF		/	/				
LAVADO		/	/				
PIPERIDINA	30	/	/				
LAVADO	5	/	/				

El siguiente diagrama corresponde a la síntesis del péptido 73-80 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, llevada a cabo por el sintetizador automático, esta gráfica corresponde al seguimiento de la conductividad en la desprotección y unión de los aminoácidos.

3.- Secuencia: OMP C 73-80 TRVAFAGL
Rendimiento: 9 mg

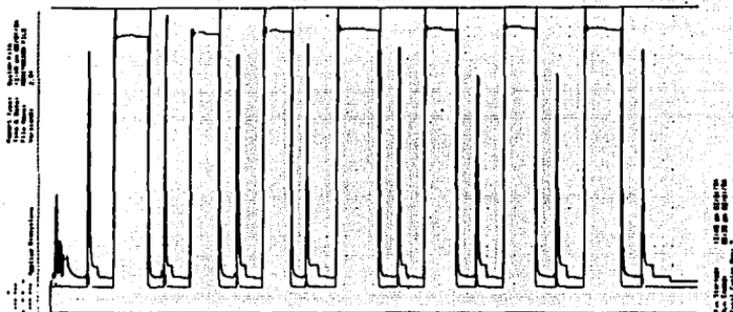
SEGUIMIENTO DE CONDUCTIVIDAD



La siguiente gráfica corresponde al seguimiento de conductividad durante la síntesis peptídica en el sintetizador automático de Applied Biosystems. En el diagrama se muestran los procedimientos de desprotección, activación y acoplamiento.

4.- Secuencia: OMP C 266-274 FEVVAQYQF

SEGUIMIENTO DE CONDUCTIVIDAD



II. PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS POR HPLC.

En la figura 1 se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación del péptido de ovoalbúmina y nos muestra tres picos sobresalientes de los cuales se obtuvo posteriormente el liofilizado. El primer pico en ser recolectado fue al minuto 22.48, el segundo al minuto 23.28 y el tercero en ser recolectado fue en el minuto 23.95 obteniéndose liofilizado solo en la segunda recolección.

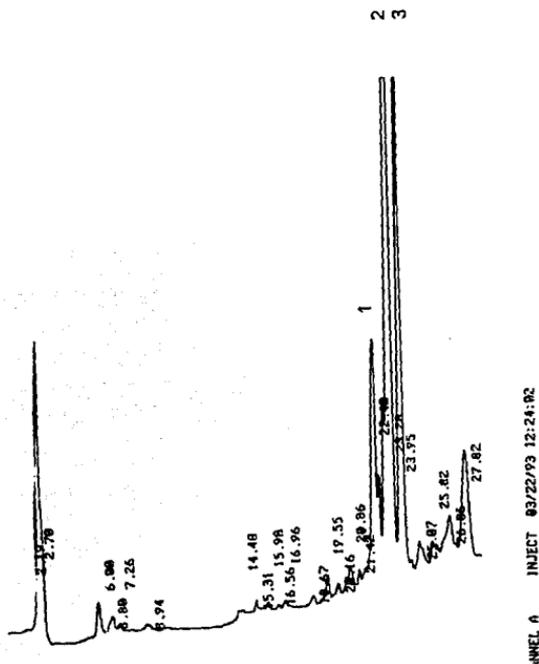


Fig 1 Cromatograma de purificación del péptido de Ovoalbúmina.

La figura 2 corresponde al cromatograma de purificación del péptido 132-139 de la proteína Omp C donde se distinguen cinco picos significativos, de estos picos solo la segunda recolección mostró producto. El primer pico recolectado fue al minuto 18.06, la segunda recolección se dió al minuto 21.10, el tercer pico de la recolección aunque es de mayor tamaño que los demás no dio producto, el cuarto esta compuesto por dos subpicos ya que al edstar muy cerca no pudieron ser separados, éstos se obtuvieron al minuto 26.19 y al minuto 26.91. El quinto pico fue recolectado al minuto 27.79.

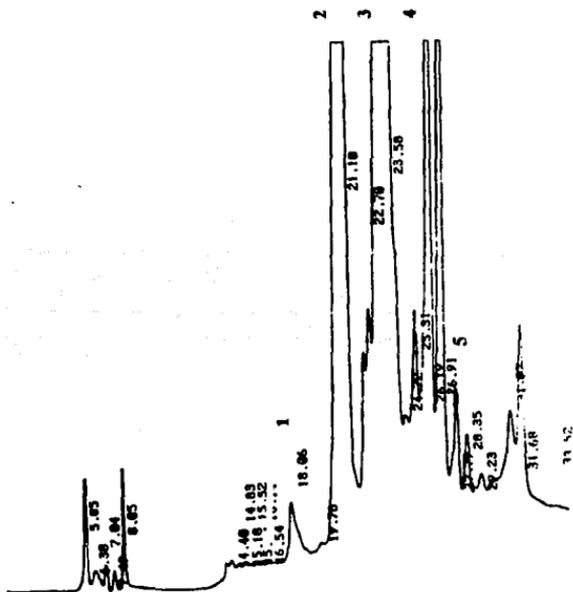


Fig 2 Cromatograma de purificación del péptido de Omp C 132-139.

La figura 3 presenta el cromatograma correspondiente a la secuencia peptídica 73-80 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*. Los tres picos recolectados y el de mayor área correspondiente a la tercer recolección del minuto 19.04, presentó producto después de la liofilización.

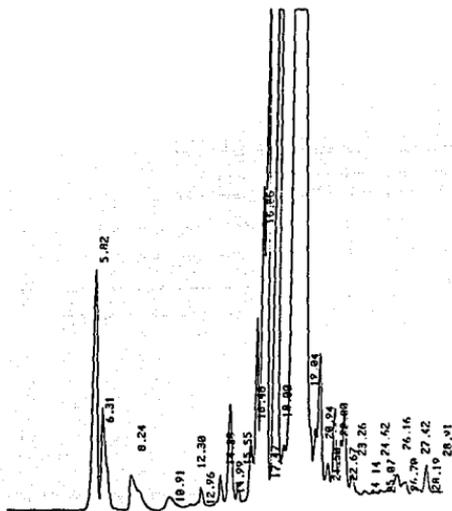


Fig 3 Cromatograma de purificación del péptido de Omp C 73-80.

En la figura 4 se aprecia el cromatograma de purificación del péptido 266-274 de la porina Omp C donde se presentan tres picos los cuales fueron recolectados al minuto 35.5 en el caso del primer pico, el segundo fue recolectado durante el minuto 38.16 y por último el tercero en el minuto 40.08, el pico de mayor área presentó producto después de ser liofilizado.

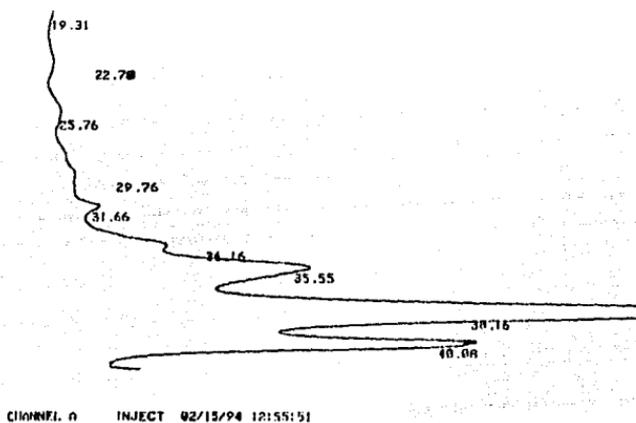


Fig 4 Cromatograma de purificación del péptido de Omp C 266-274.

III. ENSAYO DE UNIÓN ENTRE MOLÉCULAS DE CLASE I Y PÉPTIDOS SINTÉTICOS

En la figura se muestra el incremento de moléculas de clase I K^b en la superficie de las células RMA-S después de haber sido incubado con el péptido 258-266 de ovoalbúmina; la media del canal de fluorescencia (MFC) es de 4.0 para las células que no se incubaron con péptido y de 50 para las que fueron incubadas con 100 μ l del péptido este resultado indica que el péptido se unió a las moléculas vacías presentes en la superficie de las células consiguiendo con ello su estabilidad que se traduce en un cambio conformacional que permite que la molécula puede ser reconocido por los anticuerpos específicos dirigidos en contra de ella.

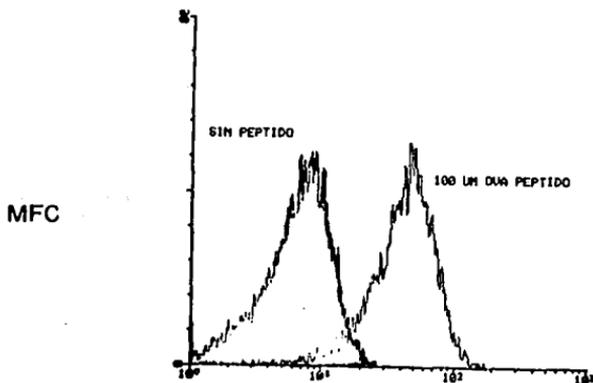


Fig 1 Efecto de la expresión de moléculas de clase I K^b en la célula RMA-S por la unión del péptido 258-266 de ovoalbúmina.

En la figura 2 observamos que el péptido 132-139 de la porina Omp C de *Salmonella typhi* también es capaz de unirse a las moléculas K^b, en este caso la media de fluorescencia fue de 30, para comparación también se muestra el efecto que se obtiene en 100µl del péptido 258-266 de ovoalbumina (MFC = 50) y la expresión de K^b de las células RMA-S que no fueron incubadas con el péptido MFC 4.0, así mismo se puede observar que ambos péptidos solamente se unen a las moléculas K^b ya que en la molécula D^b no se presenta incremento alguno.

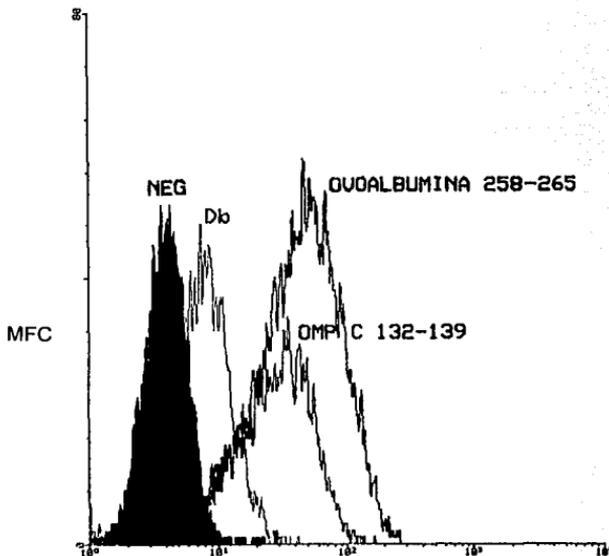


Fig 2 Efecto de la expresión de la molécula de clase I, K^b, en las células RMA-S por la unión del péptido 132-139 de la porina de *Salmonella typhi*; Omp C.

En la figura 3 se muestra una curva dosis respecto de la capacidad del péptido 73-80 de la porina Omp C de *Salmonella typhi* de inducir la estabilidad de la molécula K^b en la línea celular RMA-S. Podemos observar claramente el incremento de la expresión de la molécula K^b, mediante el empleo de dos anticuerpos dirigidos contra diferentes epitopos de la molécula K^b, uno de ellos es denominado Y3 y el otro recibe el nombre de K10.56.

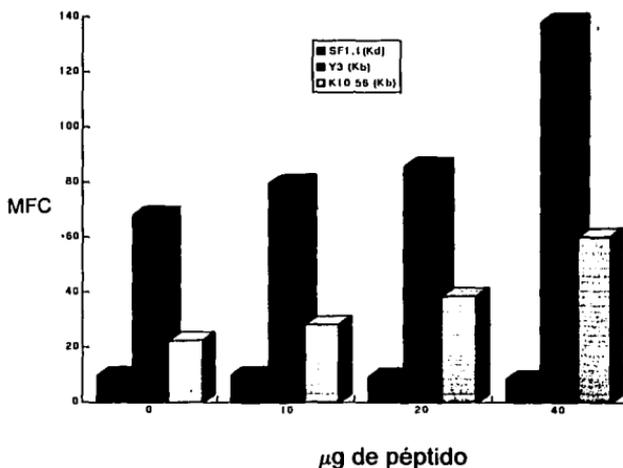


Figura 3.- Gráfica que relaciona la concentración del péptido-incremento de la expresión de moléculas de clase I K^b.

En la figura 4 se muestra la capacidad del péptido 266-274 de la porina Omp C de *Salmonella typhi*, de unirse a la molécula Db, podemos observar que el efecto es alelo específico ya que no se observó ningún incremento en la MFC de la molécula K^b.

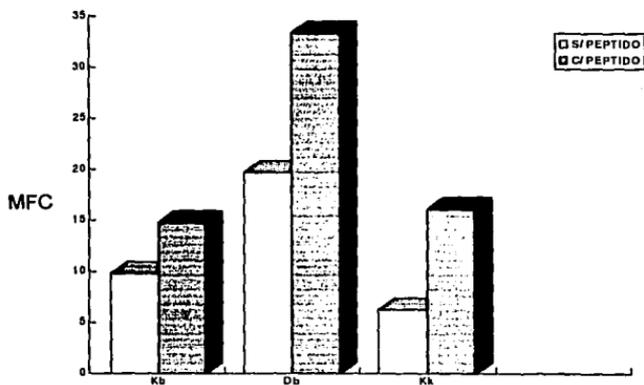


Fig 4 Unión efectiva del péptido 266-274 de la porina Omp C a la molécula de clase I Db.

DISCUSION DE RESULTADOS

La respuesta inmune celular en los individuos depende de la presentación de los antígenos relevantes a los linfocitos T. Esto se lleva a cabo por medio de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I y clase II. Las moléculas de clase I presentan péptidos que se han producido endógenamente mientras que las moléculas de clase II presentan preferentemente péptidos exógenos.

Rammensee y colaboradores encontraron que los péptidos que se presentan en el contexto de las moléculas de clase I son principalmente nonámeros y octámeros. En los péptidos eluidos de las moléculas K^b se encontró que la fenilalanina, la tirosina y la leucina se hallaban en la misma posición para moléculas correspondientes al alelo K^b y en el caso de los péptidos eluidos de las moléculas de clase I D^b los aminoácidos constantes que se presentan son la valina, arginina y metionina, a estos péptidos con aminoácidos en posiciones específicas se les ha denominado secuencias consenso o motivos. Esto significa que los péptidos que se presentan por esta vía dependen del haplotipo de la molécula de clase I. En el presente estudio se evaluó la capacidad de unión de los péptidos de la porina Omp C a las moléculas de clase I K^b y D^b, debido a que esta proteína podría estar involucrada en la respuesta inmune celular de CD8+ contra *Salmonella* y por lo tanto el primer requisito sería que dentro de su estructura se encontrarán secuencias consenso capaces de unirse a las moléculas de clase I.

El ensayo de unión entre las moléculas de clase I y los péptidos sintéticos se realizó con la línea celular RMA-S proveniente de un timoma murino, estas células tienen como característica el presentar moléculas vacías en su superficie ya que no cuentan con el péptido que las estabiliza y por lo tanto no son reconocidas por anticuerpos conformacionales contra estas moléculas lo que ha permitido buscar motivos para K^b y D^b provenientes de diferentes antígenos.

Las secuencias peptídicas de la porina Omp C al unirse efectivamente con las moléculas de clase I en experimentos in vitro

como el descrito anteriormente sugiere que la porina pudiera ser procesada y presentar estos determinantes antígenicos en el contexto de las moléculas de clase I en el curso una infección provocada por *Salmonella*. Sin embargo será necesario corroborar experimentalmente cuales de los epitopos propuestos por su capacidad de unión a las moléculas K^b y D^b pueden ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos ya que en otro sistema de once diferentes péptidos provenientes de la Listerolisina o *Listeria monocytogenes*, que presenta los motivos para unirse a la molécula K^d, solamente uno de ellos fue reconocido por una clona de CD8⁺ que se aisló de ratones infectados subletalmente con la bacteria.

CONCLUSIONES

De la secuencia de la porina Omp C se obtuvieron regiones que cumplieran con los sitios de anclaje propuestos por las investigaciones de Rammensee encontrándose motivos de nueve y ocho aminoácidos que se unieron a moléculas de clase I D^b y K^b respectivamente, del Complejo Principal de Histocompatibilidad de ratón.

Los determinantes antigénicos de la porina Omp C de *Salmonella typhi* fueron sintetizadas y probadas dando una unión efectiva, es decir, las moléculas de la superficie inestables carentes de péptido fueron capaces de estabilizarse al añadir el péptido sintético proveniente de la secuencia de la porina.

Los epitopos predichos de acuerdo a las características específicas de sus secuencias motivo pueden considerarse como potenciales epitopos para ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos con la ayuda de una investigación posterior.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS.** Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Co.USA . 2nd edition 1994.
- 2.- Bjorkman PJ,Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL,Wiley DC.** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987;329:506.
- 3.- Blanco F, Isibasi A, Ortiz V,Paniagua J, Arreguin C, Kumate J.** Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J Infect Dis* 1990,25:73-80.
- 4.- Cowan SW,Schirmer G, Rummel G,Steiert M,Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP.** Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature* 1992;358:727-733.
- 5.- Deverson EV, Gow IR, Coadwell WJ, Monaco JJ, Butcher GW, Howard JC.** MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990; 348:738-741.
- 6.- Elliot T, Cerundolo V, Elvin J, Townsend A.** Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature* 1991; 351:402-406.
- 7.- Falk K, Rötzchke, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG.** Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991; 351:290-296.
- 8.- Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA.** Crystal Structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science* 1992; 257:919-933.
- 9.- Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Willey DC.** Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 1989;342:692-696.

RECEIVED AT THE
LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF
MICHIGAN

10.- González C, Isibasi A, Ortiz V, Paniagua J, García A, Blanco F, Kumate J. *Microbiol Immunol* 1993; 37(10):793-799.

11.- Grada M, Bleek V, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^B molecule. *Nature* 1990; 348:213-216.

12.- Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, Paniagua J, González C, Moreno J, Kumate J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d. *Infect and Immun* 1988; 56:2953-2959.

13.- Jap BK. Molecular desing of Pho E porin and its funcional consequence. *J Mol Biol* 1989; 205:407-419.

14.- Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self-peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991; 353:326-329.

15.- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319:675-678.

16.- Lie WR, Myers NB, Gorka J, Rubocki RJ, Connolly JM, Hansen TH. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the L^d class I NHC molecule. *Nature* 1990; 344:439-441.

17.- Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlén et al. Empty MHC class I molecules come out in cold. *Nature* 1990; 246:476-480.

18.- Monaco JJ, Cho S, Attaya M. Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science* 1990; 250:1723-1726.

19.- Monaco JJ, McDevitt HO. The LMP antigens: a stable MHC-controlled multisubunit protein complex. *Human Immunology* 1986;15:416-426.

RECEIVED AT THE
LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF
MICHIGAN

49

- 20.- Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ.** Difference in antigen presentation to MHC class I and class II restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986;163:903-921.
- 21.- Nikaído H, Vaara M.** Outer membrane. En : Neidhardt FC, Ingraham J, Low K, Magasanik B, Schaechter M, Umbarger HE (Eds) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. 1987 Washington, D.C. USA pp 7-22.
- 22.- Ortiz-Navarrete V, Hämmerling GJ.** Surface appearance and instability of empty H-2 class I molecules under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 66:3594-3597.
- 23.- Ortiz-Navarrete V, Seeling A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hämmerling.** Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 1991;353:
- 24.- Pamer EG, Harty JT, Bevan MJ.** Precise prediction of dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1991; 353:852-855.
- 25.- Paniagua J, Sánchez J, Ramírez G, Isibasi A, Kumate J.** Genetic construction of a hybrid protein containing a *Salmonella typhi* Omp C porin epitope. *Arch Med Res* 1992; 23:200
- 26.- Paul William E.** Fundamental Immunology. Raven Press. New York 1993.
- 27.- Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC.** Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC linked transporter. *Nature* 1991; 354:528-531.
- 28.- Rivett Jennifer A.** The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 1989; 268:1-8.

29.- Röttschke O, Falk K, Deres K, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 1990; 348:252-254.

30.- Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at a 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991; 219:277.

31.- Spies T, Cerundolo V, Colonna M, Cresswell P, Townsend A, DeMars R. Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 1992;355:644-646.

32.- Spies T, DeMars R. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 1991;351:323-324.

33.- Townsend A, Ohlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340:443-448.

34.- Wei ML, Cresswell P. HLA-A2 molecules in an antigen processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* 1992; 356: 443-446.

35.- Zhang W, Young A, Imarai M, Natherson SG, Sacchettini JC. Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2K^b molecule containing a single viral peptide: Implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8403-8407.