

32  
mj



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

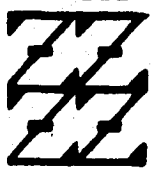
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"**

**INDUCCION DE RESPUESTA INMUNE HUMORAL  
CONTRA LA PORINA OmpC DE *Salmonella typhi*  
MEDIANTE INMUNIZACION CON ACIDO  
DESOXIRRIBONUCLEICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARIA AURELIA LOPEZ HERNANDEZ**

**U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A**



**LO RENAMO A UN  
DE HEREDERA OBLACION**

**MEXICO, D. F.**

**1996.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

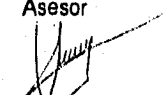
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

## JURADO ASIGNADO

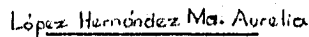
**PRESIDENTE** Q.F.B. ROSALINDA ESCALANTE PLIEGO  
**VOCAL** Dr. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE  
**SECRETARIO** Q.F.B. MARIA DE LA MERCEDES ZAMUDIO DURAN  
**SUPLENTE** Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLAN  
**SUPLENTE** Q.F.B. ARACELI GARCIA DEL VALLE

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social; bajo la tutoría del Dr. Vianney Ortíz Navarrete.

Asesor

  
Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Sustentante

  
López Hernández Ma. Aurelia  
María Aurelia López Hernández

Con todo respeto y admiración dedico este trabajo al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, le doy las gracias por compartir sus conocimientos para la realización de este trabajo y por la paciencia que me brindó durante el desarrollo de la parte experimental, así como también por los momentos en los que me permitió descubrir al amigo dispuesto siempre a escuchar y brindarme un buen consejo.

## AGRADECIMIENTOS

### A DIOS

Por ser mi guía

**A MIS PADRES**, José y Amparo por demostrarme a cada momento que la vida requiere de entrega, fortaleza y lucha constante para afrontar con valentía los retos y salir avantes. Por que en ustedes tengo a mis mejores amigos y representan el mejor regalo que la vida pudo ofrecerme. " **Los amo** "

**A MIS HERMANOS**, Marco Antonio, Martha, Víctor, Sonia, José Luis y Julieta por el apoyo que siempre me brindaron y compartir juntos momentos inolvidables.

**A MIS AMIGOS**, Arturo y Griselda por su ayuda incondicional.

**A todas** las personas que de alguna manera me motivaron a continuar mis estudios y de quienes recibí siempre buenos consejos.

Al **Dr. Guillermo López** quien me facilitó el equipo necesario para poder elaborar la parte escrita del trabajo.

Por último, dedico este trabajo a **ALFREDO** con quien me hubiese gustado compartir este momento

**Deseo agradecer al Dr. Armando Isibasi Araujo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.**

**Agradezco también la valiosa amistad y ayuda de:**

**Dr. Jorge Paniagua Solís  
Dr. César González Bonilla  
M.en C. Constantino López Macías**

**A TODOS MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO**

## CONTENIDO

### RESUMEN

I. INTRODUCCION .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
2.1. Vacunas de cuarta generación	
III. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA .....	5
3.1. Generalidades	
3.2. Clasificación	
3.3. Características funcionales y estructurales de las porinas	
3.4. Porina de <i>Salmonella typhi</i>	
3.5. Participación de la porina OmpC de <i>Salmonella typhi</i> en la inducción de Respuesta Inmune	
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
V. HIPOTESIS .....	14
VI. OBJETIVOS .....	15
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	16
VIII. MATERIALES Y METODOS .....	17
8.1. Cepas bacterianas	
8.2. Plásmidos	
8.3. Animales de experimentación	
8.4. Amplificación del gene ompC	
8.5. Construcción de vectores plasmidicos	
8.5.1. Clonación del gene sin secuencia líder en el plásmido pFM92.1	
8.5.2. Clonación del gene ompC con secuencia líder en el plásmido pJRD184	
8.5.3. Clonación del gene ompC con secuencia líder en el plásmido pFM92.1	
8.6. Purificación de ADN plásmidico por el método de Gene-clean	
8.7. Ligación de ADN plasmidico	
8.8. Transformación de bacterias	
8.9. Identificación de colonias transformadas	
8.10. Obtención de ADN plasmidico en pequeña escala por la técnica Mini-prep	
8.11. Expansión y obtención de ADN plasmidico en grandes cantidades mediante Midi-prep	

- 8.12. Purificación de ADN plasmídico por gradiente de densidad en cloruro de cesio
- 8.13. Purificación y caracterización de la porina OmpC recombinante
- 8.14. Esquema de inmunización
- 8.15. Determinación de anticuerpos mediante ensayo inmunoenzimático en fase sólida ( ELISA )

<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
9.1. Amplificación del gene ompC	
9.2. Verificación de la existencia de los genes ompC y L-ompC por electroforésis en gel de agarosa	
9.3. Construcción del vector pFM-ompC	
9.4. Identificación del gene ompC sin secuencia líder en el vector pFM-ompC	
9.5. Construcción del plásmido pIQCLM2 que porta al gene ompC con la secuencia del péptido líder	
9.6. Presencia del gene L-ompC evidenciada por corrimiento electroforético en gel de agarosa	
9.7. Construcción del vector pFM-L-ompC	
9.8. La digestión del plásmido pFM-L-ompC permite identificar al gene L-ompC con la secuencia del péptido líder	
9.9. Purificación por gradiente de densidad en cloruro de cesio de las construcciones de ADN plasmídico	
9.10. La inmunización con ADN plasmídico induce anticuerpos de tipo IgG contra la porina OmpC de <i>Salmonella typhi</i> en ratones	
<b>X. DISCUSION .....</b>	<b>34</b>
<b>XI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>XII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>38</b>
<b>XIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>39</b>



## INDICE DE FIGURAS

### **Figura 1**

Estructura tridimensional de las porinas

### **Figura 2**

Estructura cristalográfica del monómero de la porina OmpF de *E. coli*.

### **Figura 3**

Estructura secundaria propuesta para la porina ompC de *S. typhi* 9, 12, Vi: d

### **Figura 4**

La amplificación del gene que codifica para la porina ompC de *S. typhi* generó dos genes sintéticos

### **Figura 5**

Genes sintéticos ompC y L-ompC productos de la amplificación por PCR

### **Figura 6**

La clonación del gene sin secuencia líder en el vector eucariote originó el plásmido pFM-ompC

### **Figura 7**

Electroforésis en gel de agarosa que verifica la presencia del gene ompC sin secuencia líder en el plásmido pFM- ompC

### **Figura 8**

Clonación del gene L-ompC en el plásmido pJRD184

### **Figura 9**

Digestión con endonucleasas de restricción del plásmido pQCLM2

### **Figura 10**

La clonación del L-ompC proveniente del plásmido pQCLM2 en el vector pFM92.1 originó al pFM-L-ompC

**Figura 11**

La presencia del gene L-ompC fué evidenciada por la digestión y corrimiento electroforético del pFM-L-ompC

**Figura 12**

Electroforésis en gel de agarosa de las construcciones de ADN plasmídico y vector blanco después del tratamiento con cloruro de cesio

**Figura 13**

Reconocimiento de la porina OmpC recombinante por el suero de los ratones inmunizados con las construcciones de ADN plasmídico

**Figura 14**

Los anticuerpos anti-ompC muestran gran afinidad por el antígeno

## **INDICE DE TABLAS**

**Tabla 1**  
Vacunas de ADN plasmídico

**Tabla 2**  
Características funcionales y estructurales de las porinas

## **ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	ensayo inmunoenzimático en fase sólida
<b>Kb</b>	kilobase
<b>KDa</b>	kilodalton
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>MHC</b>	complejo principal de histocompatibilidad
<b>OmpC</b>	proteína de membrana externa de bacterias gram negativas
<b>PBS</b>	amortiguador de fosfatos
<b>SDS</b>	duodecil sulfato de sodio
<b>SDS - PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

## RESUMEN

Existen evidencias que indican que las proteínas de membrana externa se encuentran expuestas en la superficie de las bacterias gram negativas, y por tanto están accesibles a las células del sistema inmune por lo que se consideran antígenos capaces de inducir respuesta inmune protectora. En un modelo de ratón se ha demostrado que las proteínas de membrana externa denominadas porinas son capaces de inducir respuesta inmune específica contra la infección por *Salmonella typhi*, sin embargo la obtención de preparaciones de porinas con alto grado de pureza lo que resulta imposible debido a la estrecha relación que existe entre estas proteínas y el lipopolisacárido, el cual presenta actividad biológica a muy bajas concentraciones y su eliminación es costosa.

Actualmente una nueva modalidad de particular interés pone de manifiesto la utilización como inmunógeno de ADN que codifica para una proteína específica permitiendo que las células del hospedero produzcan a la proteína inmunogénica y la presenten más fácilmente al sistema inmune.

En este trabajo se reporta que la inoculación intramuscular de ADN plasmídico codificando para la porina OmpC de *Salmonella typhi* es capaz de inducir en ratones la producción de anticuerpos específicos contra esta proteína después de la inmunización con el material genético.

El ADN plasmídico inoculado fué obtenido mediante extracciones alcalinas de las construcciones pFM-ompC y pFM-L-ompC resultado de la clonación del gene ompC presentando la secuencia del péptido líder y careciendo de ésta en el vector de expresión eucariote pFM92.1 bajo el promotor de  $\beta$ -actina.

Considerando que las vacunas utilizadas contra la fiebre tifoidea presentan efectos colaterales adversos debido a la contaminación por lipopolisacárido, la inmunización con ADN plasmídico puede ser utilizada como modelo para posteriores análisis que determinen en un futuro la elaboración de una vacuna contra *Salmonella typhi* utilizando la transferencia de genes "in vivo".

## I. INTRODUCCION

La prevención de enfermedades es uno de los grandes problemas que la sociedad científica ha tenido que afrontar a través de la historia de la humanidad. Aproximadamente hace 200 años, Edward Jenner realizó los primeros estudios que marcan el inicio de la inmunología desarrollando la primera estrategia de vacunación, quedaba sin embargo por esclarecer los mecanismos que operaban en la protección que conferían sus preparaciones, así como los mecanismos de patogenidad generados por los diversos microorganismos para producir enfermedad. Mucho del conocimiento al respecto se ha obtenido precisamente al analizar los efectos vacunales de dichas preparaciones, retroalimentando el planteamiento de nuevas posibilidades para lograr programas de inmunización enriquecidas con las aportaciones de otras ramas del conocimiento biológico.

Durante la década pasada los adelantos tecnológicos de la biología molecular y estructural estuvieron enfocados en el análisis detallado del sistema inmune. Se cuenta con información sobre la estructura del receptor para el antígeno en las células B y datos relevantes sobre la estructura y función del complejo formado por el receptor de células T, así como de las moléculas codificadas por los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad ( MHC ). La estructura tridimensional de las moléculas clase I y clase II del MHC se ha podido determinar mediante la utilización de la cristalografía de rayos X, estudios que permiten establecer como el receptor de antígeno en la célula T es capaz de reconocer pequeños péptidos provenientes de proteínas antigénicas extrañas tales como polipéptidos bacterianos o virales, unidos a las moléculas de clase I y II del MHC en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Los nuevos conocimientos basados en el reconocimiento antigénico por la células T y de los mecanismos que generan los péptidos presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad ( procesamiento de antígeno ) permite el desarrollo de nuevas estrategias de manipulación de la respuesta inmune.

Una de las áreas de la inmunología que tiene gran impacto hoy en día está encaminada a la creación de nuevas vacunas empleando los adelantos de la ingeniería genética. De tal forma que una nueva modalidad de particular interés pone de manifiesto la utilización como inmunógeno de ácido desoxirribonucleico ( ADN ) que codifica para una proteína específica. La inoculación intramuscular de ADN permite la expresión de la proteína que codifica por períodos de tiempo considerablemente prolongados lo que induce una respuesta inmune específica mientras que el análisis del estado físico del ADN plasmídico inoculado indica hasta el momento que no existe evidencia que respalde su integración al genoma de las células musculares del huésped, sugiriendo que puede persistir como un episoma funcional en las células transfectadas.

## II. ANTECEDENTES

Las vacunas son preparaciones inmunogénicas inócuas que al ser inoculadas a individuos inmunocompetentes inducen una respuesta inmune

protectora y se han clasificado en base a los componentes que las constituyen como:

- 1.- Vacunas de primera generación: elaboradas a base de microorganismos muertos.
- 2.- Vacunas de segunda generación: elaboradas con microorganismos atenuados ( avirulentos ).
- 3.- Vacunas de tercera generación: elaboradas con moléculas o subunidades del agente infeccioso

Los avances científicos y tecnológicos han permitido la aparición de una nueva generación de vacunas entre las que se incluyen:

a) "VACUNAS RECOMBINANTES". Basadas en la clonación de los genes de microorganismos en vectores que permitan la expresión de los antígenos importantes.

b) "VACUNAS CONJUGADAS". Que utilizan la conjugación química de antígenos relevantes en la inducción de respuesta inmune ( como polisacáridos y proteínas ).

c) "VECTORES O ACARREADORES VIVOS ATENUADOS". Aquellas que emplean vectores bacterianos o virales vivos y atenuados, tanto por sí solos, o bien como acarreadores de proteínas de microorganismos patógenos..

f) "VACUNAS DE ADN O DE CUARTA GENERACION". En donde la utilización de ADN como agente vacunal permite que las células del hospedero produzcan a la proteína inmunogénica y la presenten más fácilmente al sistema inmune.

## 2.1. VACUNAS DE CUARTA GENERACION

Las observaciones hechas por J. Wolff y col.<sup>3</sup> de que el ADN plasmídico codificando el gene de la enzima beta-galactosidasa bajo un promotor de células eucariotes podía ser expresado después de la inoculación intramuscular sin adyuvante o algún sistema que sirviera como acarreador al ser administrado en un grupo de ratones y que la expresión de tal enzima se mantenía por tiempo indefinido en dichos animales, iniciaron una gran cantidad de actividades relacionadas con la transferencia de genes "in vivo". Posteriormente la inoculación de material genético dentro de partículas recubiertas de oro<sup>90</sup> demostró expresión de la proteína en el tejido e inducción de respuesta inmune específica al detectar niveles considerables de anticuerpos dirigidos contra la hormona de crecimiento humano ( hGH ) en esos animales<sup>9</sup>

En 1993 J. Ulmer y col.<sup>1</sup> dieron a conocer que la vacunación de ADN con el gene codificando a la nucleoproteína ( NP ) del virus de la influenza era capaz de inducir respuesta inmune específica tanto humoral como celular y brindar niveles de protección del 90% en un modelo de ratón. Estos estudios iniciaron la era de la inmunización con ácido desoxirribonucleico, ya que su eficacia se ha

demostrado en diversos modelos que emplean material genético codificando proteínas virales, bacterianas o de parásitos indicando el gran potencial que aporta esta tecnología para el desarrollo de vacunas animales y de uso humano. En el siguiente cuadro se presentan algunas de las vacunas experimentales desarrolladas a la fecha a base de ADN plasmídico:

ANTIGENO	RESPUESTA INMUNE		
	Células B	Células T	PROTECCION
Nucleoproteína del Virus de la Influenza (NP)	Sí	Sí	90%
Hemaglutinina del Virus de la Influenza (HA)	Sí	Sí	78.9%
Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B (HBsAg)	Sí	-	Sí
Proteína circunsporozoítica de <i>Plasmodium falciparum</i>	Sí	Sí	83%
Proteína de superficie de <i>Leishmania major</i> (gp83)	-	Sí	Sí
Proteína term estable de <i>Mycobacterium leprae</i> (hsp65)	-	Sí	Sí
Proteína de superficie del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (gp180)	Sí	Sí	85%

Tabla 1. Vacunas de ADN. Wolff, J. A; et.a.l 1994<sup>15,16,17,18,19</sup>



Dentro de las ventajas que ofrecen este tipo de vacunas encontramos las siguientes:

- 1.- Expresión del antígeno en su estado nativo, mejorando en ello su procesamiento y presentación al sistema inmune
- 2.- Facilidad para elaborar vacunas combinadas
- 3.- Posibilidad para reducir el número de dosis inmunizantes por la prolongada exposición del antígeno
- 4.- Facilidad de producción a nivel industrial

El empleo de material genético constituye un método nuevo e inusual para inducir una respuesta inmune específica. El ADN es capaz de introducirse en el tejido del huésped mediante inoculación directa por vía intramuscular en el cuádriceps de ratones; la proteína codificada y los elementos que regulan su expresión son factores determinantes para que el número de células transfectadas y la cantidad de proteína producida sea suficiente para inducir respuesta inmunológica. Sin embargo, existen muchas incógnitas por resolver; aún no se conoce el mecanismo por medio del cual el ADN es internalizado por la célula permitiendo la expresión del producto del gene y cuáles podrían ser los efectos colaterales adversos por la inmunización, así como determinar si la prolongada expresión del antígeno pudiese llegar a generar tolerancia inmunológica periférica.

### III. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA ( PME )

#### 3.1. GENERALIDADES

Las proteínas de membrana externa de las bacterias gram negativas son moléculas de superficie involucradas en la patogénesis de enfermedades bacterianas y le confieren a éstas la capacidad de ser resistentes a la fagocitosis y a la actividad del complemento, han cobrado gran importancia en la inducción de inmunidad específica durante la infección por dichas bacterias y su estudio está encaminado en tratar de establecer el papel que desempeñan durante la relación huésped-parásito mediante el desarrollo de técnicas que permitan separar para su estudio la membrana externa de la membrana citoplasmática.

Miura y Mizushima describieron por primera vez el aislamiento de la membrana externa de *Escherichia coli* utilizando esferoblastos preparados con lizosima y EDTA, lisando a la bacteria por choque osmótico y posteriormente separando la membrana citoplasmática mediante un gradiente de sacarosa<sup>28</sup>.

Schnaitman describe una metodología que evita la utilización de esferoblastos, el empleo de una prensa francesa para destruir la bacteria hace posible que la membrana sea solubilizada en un detergente no iónico y poder identificar las PME mediante corrimiento electroforético. Fué así como se reportó que la bacteria *E. coli* contenía una proteína principal que constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana; posteriormente otros estudios permitieron establecer que no se trataba de una sola proteína sino de cuatro proteínas; sin embargo el número de PME presentes varía de acuerdo a la información genética de las bacterias y su expresión puede verse afectada por las condiciones de cultivo<sup>30,31</sup>.

#### 3.2. CLASIFICACION

Las proteínas de membrana externa que más se han estudiado son las de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, Di Rienzo, Nakamura e Inouye clasificaron a estas en proteínas principales y menores<sup>32</sup>. Las principales pueden estar expresadas con más de 100 mil copias por célula y se han descrito alrededor de 10, sin embargo sólo 5 de ellas se expresan. Dentro de las proteínas principales encontramos las siguientes:

I.- Proteína modificable por el calor ( OmpA ), involucrada en procesos de conjugación y se ha establecido su papel como receptor de fagos y colicinas.

II.- Lipoproteína de Braun, la cual se encuentra unida covalentemente a la peptidoglicana y tiene como función principal mantener la integridad funcional y estructural de la membrana.

III.-Proteínas matrices o porinas, dichas proteínas reciben este nombre por su propiedad de formar canales o poros de difusión a través de la membrana permitiendo el paso de pequeños solutos ( 400 a 600 Da ) al interior de la bacteria y sirven como receptores para fagos y colicinas. Se encuentran asociadas

estrechamente a la peptidoglicana y al lipopolisacárido ( LPS ) de forma no covalente ( Figura 1 ).

### 3.3. CARACTERISTICAS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LAS PORINAS

La estructura monomérica de la porina es un polipéptido de 336 residuos en promedio, estos monómeros se ensamblan en el espacio periplásmico de la bacteria para incorporarse posteriormente a la membrana externa donde se encuentran como homotrimeros en cantidades elevadas (10<sup>5</sup> copias por célula), el peso molecular de las unidades monoméricas va de 36 a 42 Kda.

Las porinas presentes en la membrana externa de las bacterias gram negativas o en un estado isotrópico (después de la solubilización con detergente) presentan una estabilidad inusual que es explicada por sus características estructurales.

En 1980 Rosenbush y col. reportaron la estructura cristalográfica de la porina porina OmpF de *E. coli*, el análisis por difracción de rayos X mostró que el esqueleto de la porina está formado por 16 regiones de hojas beta plegadas antiparalelas de 40A que atraviezan la membrana unidas entre sí en sus extremos por 7 asas cortas ( 2-5 aminoácidos ) orientadas hacia el espacio periplásmico y 8 asas largas ( 5-44 aminoácidos ) expuestas al medio extracelular con alfa hélices intercaladas formando una estructura cilíndrica al cerrarse la estructura beta de manera pseudocíclica mediante un enlace iónico entre el extremo carboxilo de la hoja beta-16 y el extremo amino de la hoja beta-1; el segmento transversal es de 10-12 aminoácidos y contiene aminoácidos polares orientados de forma perpendicular al plano de la membrana ( Figura 2 ). Una parte inferior del poro o canal ( poro de difusión hidrofílico con un diámetro promedio de 1.5-2.0 nm ) se encuentra revestido por aminoácidos cargados, el número y posición de estas cargas determina la selectividad iónica de los canales; además, la entrada al poro está restringida por las asas largas y dispares que se extienden hacia el centro generando un diámetro de 11 a 19 Å, la salida del poro al espacio periplásmico tiene dimensiones de 15 x 22 Å y está definida por las vueltas beta.

A la fecha las porinas conocidas son OmpC, OmpF y PhoE de *Escherichia coli* y OmpC, OmpF y OmpD de *Salmonella typhimurium*, compuestas de subunidades de 38000-40000 Da, son semejantes entre sí y sólo difieren en alguna secuencia de aminoácidos, en su selectividad y afinidad por grupos iónicos a excepción de PhoE llamada también fosporina quien tiene predilección por los fosfatos. Diversas porinas pueden ser expresadas en la misma bacteria presentando una gran homología entre sus secuencias de aminoácidos ( más del 60% ) considerando sus estructuras muy similares entre sí.

La síntesis de porinas es regulada de diversas maneras, en *E. coli* por ejemplo la elevada osmolaridad ocasiona que una proteína de membrana citoplasmática denominada EnvZ fosforile a una proteína reguladora citosólica

denominada OmpR quien a su vez reprime la expresión de OmpF e incrementa la expresión de OmpC. La expresión de los canales sobre la superficie de la membrana externa es regulada en respuesta a condiciones específicas del medio ambiente tales como la temperatura, osmolaridad, pH, composición del medio de cultivo, niveles de sales y fosfatos, así como la diferencia de potencial eléctrico; en un medio de cultivo común ( condiciones normales de C y N ) sólo OmpF, OmpC y OmpD se producen. PhoE también llamada fosfoporina se expresa sólo en condiciones de escases de fosfatos y OmpC es sobre expresada en condiciones elevadas de sales, la expresión de OmpF se reprime por la temperatura y osmolaridad elevados.

La estructura tridimensional de las porinas permite explicar muchas de sus propiedades funcionales, por ejemplo: PhoE muestra mayor afinidad por aniones, mientras que OmpC y OmpF tienden a preferir los cationes. Las porinas OmpC y OmpD son proteínas funcionalmente semejantes, el diámetro de sus poros varía de 1.1 a 1.3 nm y se piensa que estas dos proteínas, así como la porina PhoE evolucionaron de una proteína ancestral común ya que las secuencias protéicas contienen un 63% de homología en cuanto a identidad de aminoácidos y un 80% de identidad funcional.

### CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PORINAS

#### 1) *E. coli* 2) *S. typhimurium*

PORINAS	PESO MOLECULAR (Kda)	DIAMETRO APROXIMADO (nm)	REGULACION DE LA SINTESIS	RECEPTOR A FAGOS Y COLICINAS
OmpF	1) 32.7 2) 39.3	1) 1.2 2) 1.2	Reprimida por alta osmolaridad	1) Tula, T2, TP1, TP2, TP8, ColA 2) No determinada
OmpC	1) 36.0 2) 39.3	1) 1.1 2) 1.2	Desreprimida por alta osmolaridad	1) Tui b, Mel, PA2, 434, SS1, TP2, TP8, TP8 2) PH42, PH105, PH221
OmpD	1) No tiene 2) 38.0	1) No tiene 2) 1.3	Dependiente de AMPc	1) No tiene 2) PH31, PH42, PH51
PhoE	1) 36.8 2) 36.0	1) 1.2 2) 1.2	Desreprimida por escases de fosfatos	1) TC23, TC45 2) No identificado

**Tabla 2.** Proteínas de membrana externa de bacterias gram negativas. Di Rienzo, J; Nakamura, K. 1978<sup>36,38</sup>

### 3.4. PORINA DE *Salmonella typhi*

La porina OmpC de *Salmonella typhi* presenta 378 aminoácidos en su forma inmadura y 357 aminoácidos como proteína madura. Tiene un 83% de homología con la OmpC de *Escherichia coli* y un 85% con la de *Salmonella typhimurium*, mientras que presenta un 80% con la OmpF de *E. coli*, permitiendo deducir que las estructuras conformacionales son muy semejantes; análisis de predicción de estructura secundaria indican la semejanza entre la OmpC y la OmpF de *E. coli*. Por tanto cabe suponer que OmpC cuenta con 16 hojas beta plegadas de las cuales 8 se encuentran orientadas al espacio periplásmico y 8 al medio extracelular ( Figura 3 ).

Los datos anteriores se apoyan en la demostración de que las regiones correspondientes a las asas 7 y 8 se encuentran expuestas sobre la superficie de la bacteria por ser accesibles a anticuerpos contra esas regiones<sup>58</sup>. La actividad funcional de la porina OmpC de *Salmonella typhi* no ha sido estudiada en detalle por lo que no se conoce la selectividad del poro, pero dada la semejanza con la OmpC de *Escherichia coli* como a la de *Salmonella typhimurium* se considera que también presenta selectividad por solutos neutros y cationes, tampoco se conoce cuales son los fagos y colicinas que se unen a ella.

### 3.5. PARTICIPACION DE LA PORINA OmpC DE *Salmonella typhi* EN LA INDUCCION DE RESPUESTA IMMUNE

Existen evidencias que indican que las proteínas de membrana externa se encuentran expuestas en la superficie de las bacterias gram negativas, y por lo tanto están accesibles a las células del sistema inmune considerándoseles como antígenos capaces de inducir una respuesta inmune protectora. Los estudios sobre estas proteínas se han enfocado en tratar de establecer el papel que desempeñan en la inducción de inmunidad específica, en los que se demostró que la inmunización con PME de *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* inducen un estado de protección contra la infección causada por estas bacterias en un modelo de ratón.

En 1988 se demostró la importancia de las PME de *S. typhi* en la inducción de inmunidad protectora contra el reto de la bacteria viva al inmunizar ratones con una suspensión de 30ug de PME conteniendo 4% de LPS<sup>90,91</sup> como contaminante y conferir protección del 100% al reto con 500DL<sub>50</sub> de dos cepas de *Salmonella typhi* ( 9,12,Vi:d cepa aislada de un paciente con fiebre tifoidea y Ty2 cepa vacunal ) y una protección del 30% al reto con 500DL<sub>50</sub> de *S. typhimurium*; la protección cruzada generada por ambas bacterias sugiere que los determinantes antigénicos que reconocen estos anticuerpos se comparten en ambas bacterias.

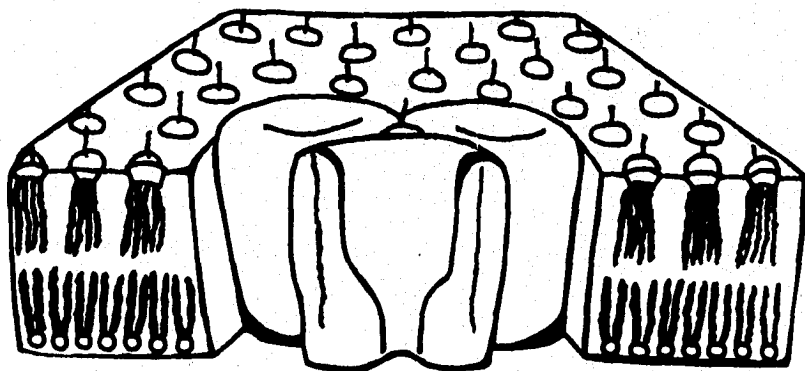
La administración de un suero de conejo anti-PME de *S. typhi* 9,12.Vi:d induce un estado de protección pasiva al reto con 100DL<sub>50</sub> de la bacteria homóloga y una protección del 80% al reto con *S. typhimurium* en el modelo de ratón; al realizar ensayos de protección activa utilizando 1.2ug de LPS como antígeno el resultado fué una protección del 40% al reto con 100DL<sub>50</sub> de *S. typhi* 9,12.Vi:d y *S. typhimurium*, indicando que los antígenos responsables de inducir protección son las PME y no el LPS.

Una preparación altamente purificada de dos porinas fué capaz de inducir el 100% en ratones con 20 DL<sub>50</sub> de *S. typhi*, mientras que dosis de porinas de 10 o 30ug indujeron 90% de protección al reto con 500DL<sub>50</sub> de la bacteria homóloga y solamente 30% de protección al reto con la cepa heteróloga cuando se inmunizan con la misma dosis de porinas. Se identificó a la porina OmpC como una de las dos porinas utilizadas como agente vacunal y su producción como proteína recombinante ha permitido analizar su papel en la inducción de inmunidad protectora<sup>63</sup>.

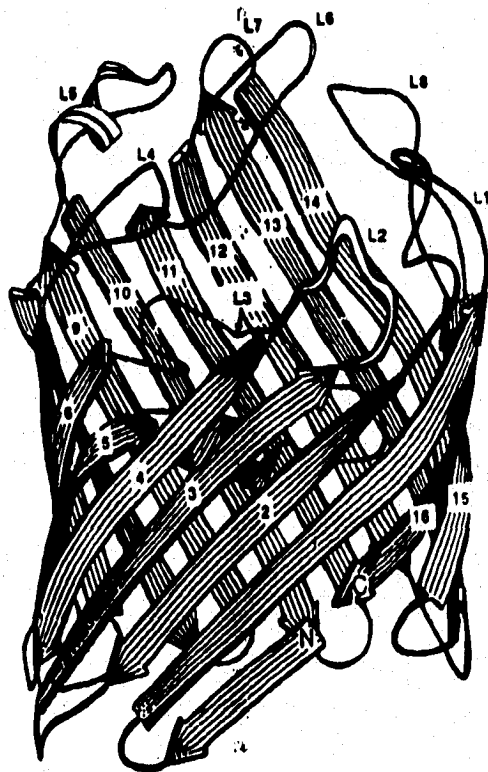
En pacientes con fiebre tifoidea los anticuerpos que se generan en la etapa aguda de la enfermedad son de tipo IgM mientras que anticuerpos de tipo IgG están presentes en la etapa de convalecencia, los primeros anticuerpos reconocen a una proteína con un peso molecular aproximado de 28kda y los segundos a proteínas con pesos moleculares de 38 a 41 Kda correspondientes a las porinas, lo que demuestra que la respuesta inmune humoral está dirigida contra las porinas y que tiene un papel fundamental en el control de la infección mediada por complemento, ya que los anticuerpos anti-porinas reconocen determinantes antigénicos en la superficie de la membrana externa activando a 3 de las proteínas fundamentales para iniciar la cascada enzimática y la generación de complejos peptídicos de gran actividad con la subsecuente formación del complejo C5-C9 denominado Complejo de Ataque a la Membrana ( MAC ), el cual puede insertarse en la membrana y ejercer su efecto lítico sobre la bacteria.

La participación de la respuesta inmune celular en el control de la infección por *S. typhi* se ha demostrado por ensayos de proliferación celular indicando que las porinas aisladas de esta bacteria inducen proliferación de linfocitos T en un modelo murino<sup>63</sup>.

La búsqueda de los determinantes antigénicos de OmpC de *Salmonella typhi* que permiten llevar a cabo la generación de respuesta inmune, ha sido posible considerando la semejanza estructural y conformacional que presenta la OmpC de *E. coli* y la de *S. typhi*. El análisis de la secuencia de la OmpC de *Escherichia coli* permitió identificar a las regiones 246-254 y 285-303 de la porina OmpC de *Salmonella typhi*, como epítopos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos al ser capaces de reconocer determinantes antigénicos presentes en la bacteria completa; dichas secuencias corresponden a los loops 6 y 7, regiones que se hayan expuestas en la superficie haciéndolas más accesibles al reconocimiento por anticuerpos.

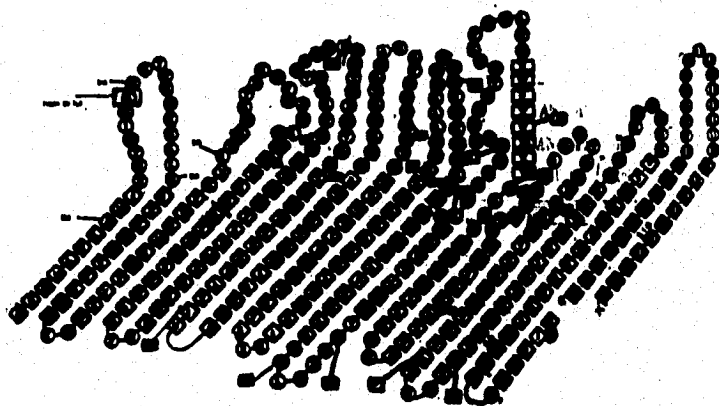


**Figura 1.** Estructura tridimensional de las porinas  
Modelo propuesto por JAP para la porina PhoE ( 1989 ). Cristalografía electrónica  
con una resolución de 18 armstrongs<sup>43</sup>



**Figura 2.** Estructura cristalográfica del monómero de la porina OmpF de *Escherichia coli*<sup>42</sup>





**Figura 3.** Estructura secundaria propuesta para la porina OmpC de *Salmonella typhi* 9, 12, Vi: d, a partir de una comparación con los resultados de Cowan<sup>41,42</sup>

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente no se cuenta con una vacuna confiable y efectiva contra la fiebre tifoidea, las vacunas elaboradas con bacterias muertas causan reacciones colaterales debido a la endotoxina; la elaborada con una cepa atenuada así como la obtenida a partir de antígeno Vi inducen inmunidad parcial y de corta duración.

En un modelo de ratón se ha demostrado que las proteínas de membrana externa ( PME ) denominadas porinas son capaces de inducir respuesta protectora contra el reto con la bacteria viva. La respuesta inmune humoral y celular juega un papel importante en dicha protección, sin embargo el principal inconveniente en las preparaciones de porinas obtenidas por los métodos bioquímicos convencionales se debe a que siempre contienen como contaminante al lipopolisacárido ( LPS ), además de que su manipulación se ve afectada por ser proteínas altamente hidrofóbicas, es por esto que la inoculación de ADN plasmídico representa una alternativa para eliminar los problemas que se presentan en la generación de una vacuna contra *Salmonella typhi*.

## V. HIPOTESIS

La inmunización con el ADN plasmídico con el gene que codifica para la porina OmpC de *Salmonella typhi* es capaz de generar respuesta inmune específica contra esta proteína

## VI. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

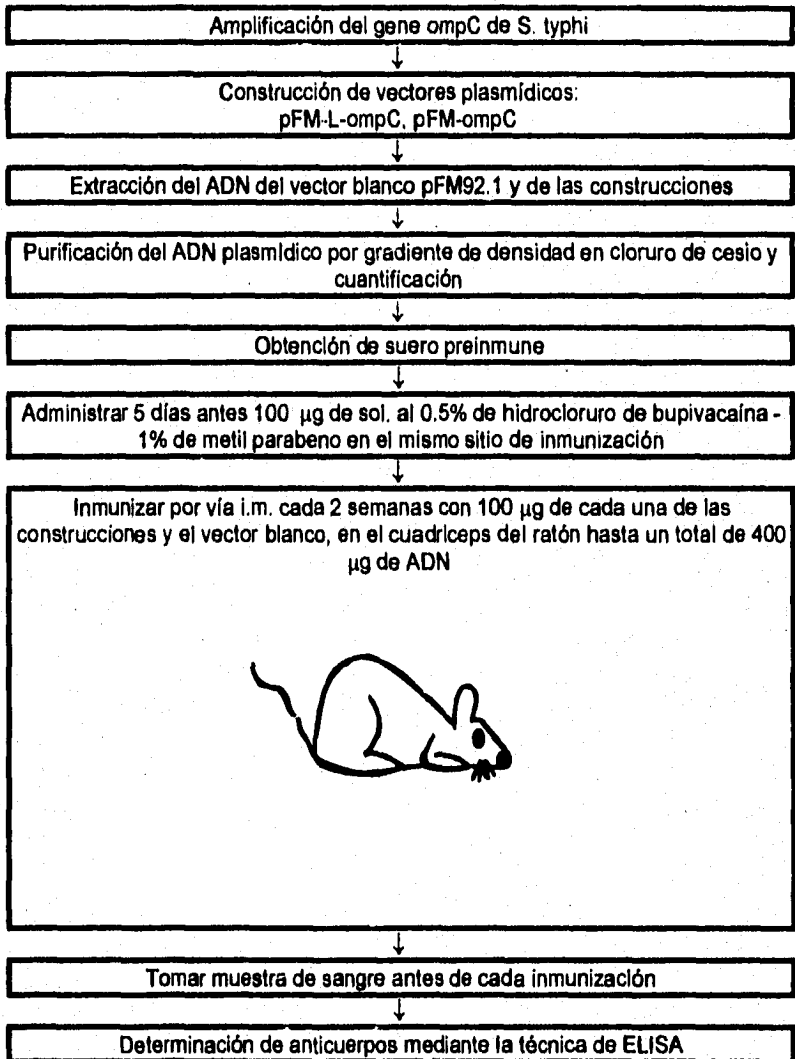
- Determinar el tipo de respuesta inmune específica generada por la porina OmpC de *Salmonella typhi* después de la inmunización con ADN plasmídico conteniendo el gene que codifica para dicha proteína

### 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Amplificar el gene de OmpC de *Salmonella typhi* y clonarlo con su secuencia líder y careciendo de ésta, en el correspondiente vector de expresión eucariote pFM92.1

- Expandir las construcciones de ADN plasmídico y purificarlas por gradiente de cloruro de cesio ( CsCl )

- Realizar esquema de inmunización y evaluar la generación de anticuerpos anti-OmpC mediante el ensayo inmunoenzimático ( ELISA )

**VII. DISEÑO EXPERIMENTAL**

## VIII. MATERIALES Y METODOS

### 8.1. Cepas bacterianas

- a) *Escherichia coli* DH10B ( Gibco, BRL )
- b) *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  FIQ

### 8.2. Plásmidos

- a) pH $\beta$ actinPr1-Noe-XB ( pFM92.1 ) Donado por el Dr. Frank Momburg, Instituto de Inmunología y Genética del Centro Aleman de Investigación en Oncología, Alemania.
- B) pJRD184. Donado por el Center for Vaccine Development, Baltimore USA.

### 8.3. Animales de experimentación

Ratones Balb/c. Donados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos ( INDRE )

### 8.4. Amplificación del gene *ompC*

El gene *ompC* se amplificó del plásmido pST13<sup>61</sup> por la reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ). Dos genes sintéticos fueron obtenidos mediante PCR utilizando la secuencia reportada para el gene<sup>62</sup>, uno incluye la secuencia del péptido líder y el otro carece de ésta. Los tres oligos diseñados fueron el primer F73, incluye un sitio de restricción EcoRI, un sitio de unión a ribosoma (RSB), codón de inicio (CI) y la secuencia líder de OmpC (CCGGGAATTCAGGAGTAATTAATGAAGTTAAGTACTGTCC) ; el primer F72 incluye un sitio de restricción HindIII, RBS, IC y la secuencia amino terminal de OmpC madura (CGGGGAAGCTTAGGAGTAATTAATGGATGCTCGAARRRRAAARAAGACGGCAACAAA).

El primer F74 (CGGGGATCCTTAGAATTCGAAGCTGGTAACCAACCCAG) que incluye un sitio de restricción BamHI y un codón de terminación fué el iniciador reverso.

La presencia de los productos de reacción fué evaluada mediante electroforesis horizontal ( Horizon 5-8, BRL ) en gel de agarosa ( Gibco, BRL ) al 1% en buffer TAE ( 40 mM de Trisbase en ácido acético glacial, 1mM EDTA pH=8 ); el corrimiento se realizó a 77 volts durante 45 minutos.

### 8.5. Construcción de vectores plasmídicos

La clonación de los genes se llevó a cabo de manera independiente en los sitios de restricción correspondientes al plásmido parental pFM92.1 bajo el promotor de beta-actina.

#### 8.5.1. ***Clonación del gene ompC sin secuencia líder en el plásmido pFM92.1***

El plásmido pFM92.1 y el gene OmpC sin líder producto de la amplificación por PCR se trataron con las enzimas de restricción Hind III y BamHI durante 2 hrs. a 37°C. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa visualizándose las bandas de interés al ser colocado el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta. los fragmentos fueron cortados para su purificación mediante una técnica que separa el ADN plasmídico de interés de la agarosa ( Gene-clean ) y la posterior unión vector- inserto ( Ligación ). Para transformar la cepa de *Escherichia coli* DH10B se utilizaron 5 µl de la mezcla de ligación mediante una técnica que emplea Cloruro de Calcio 100 mM: las bacterias transformadas se cultivaron en cajas con agar Luria suplementado con 50 µg/ml de ampicilina y las que resultaron resistentes al antibiótico se crecieron de forma individual en 3 ml de caldo Luria con 50 µg/ml de ampicilina 8 hrs/ 37°C, para la posterior extracción de ADN plasmídico en pequeña escala ( Mini-prep ). Así, el ADN obtenido por este tratamiento se sometió a digestión con las enzimas de restricción Hind III y BamHI para verificar en un gel de agarosa la presencia del gene OmpC sin líder en el vector de expresión eucariote pFM92.1.

#### 8.5.2. ***Clonación del gene de ompC con secuencia líder en el plásmido pJRD184***

El gene ompC obtenido por PCR se sometió a digestión con la enzima BamHI, los productos de reacción fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa. El gene ompC se purificó por gene-clean, mientras que el pJRD184 fué digerido con las enzimas Eco RV y BamHI, los productos de reacción fueron tratados de la misma forma que el gene de ompC para poder ser ligados y transformados en *E.coli* DH5α F1Q. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio Luria con 50 µg/ml de ampicilina y la búsqueda del plásmido construido se realizó por la técnica mini-prep de las colonias seleccionadas. La identificación del plásmido se hizo utilizando las enzimas de restricción Hind III, BamHI y Eco RI y una vez crecidas las colonias en 500 ml de caldo Luria con ampicilina se extrajo el ADN plasmídico en gran escala mediante de la técnica midi-prep.

#### 8.5.3. ***Clonación del gene de ompC con secuencia líder en el plásmido pFM92.1***

El ADN plasmídico de la extracción del plásmido pQCLM2, fué digerido con las enzimas Hind III y BamHI. De esta mezcla de ligación se separó el producto de 1.3 Kb mediante electroforesis en gel de agarosa purificándose el fragmento por gene-clean. Por otro lado se digirió el plásmido pFM92.1 con Hind III y Bam HI separándose así un producto de 10 Kb que también se purificó para realizar la ligación y transformar así la cepa *E. coli* DH10B. Las colonias transformadas se seleccionaron en agar Luria con ampicilina y la búsqueda del

gene se realizó por mini-prep. Las colonias que contenían el vector construido fueron seleccionadas para extraer el plásmido en grandes cantidades mediante la extracción a gran escala ( midi-prep ).

#### **8.6. Purificación de ADN plasmídico por el método de Gene-clean**

Las bandas correspondientes a los productos de la digestión fueron cortados de los geles de agarosa y depositados en tubos eppendorf, a los que se adicionaron 800  $\mu$ l de NaI ( yoduro de sodio) 6M. para incubarse 5 min./55°C. Una vez disuelta la agarosa fueron adicionados 5  $\mu$ l de perlas de vidrio, la mezcla se incubó en hielo 5 min. ( agitando el tubo frecuentemente ); una centrifugación a 13,000 rpm fué necesaria para sedimentar las perlas y eliminar el sobrenadante por decantación, lavando las perlas tres veces con una solución amortiguadora que contiene ( 50% de una solución de Tris 20 mM, pH=7.4; 1 mM EDTA. 0.1 M NaCl y 50% de etanol ); cuando los lavados se realizaron las perlas nuevamente se incubaron con 20  $\mu$ l de agua destilada a 56°C seguidos de centrifugación a 13,000 rpm/10 min., operación que se efectuó nuevamente y que fué suficiente para separar el ADN plasmídico de las perlas y verificarlo en un gel de agarosa.

#### **8.7. Ligación de ADN plasmídico**

En un tubo eppendorf se mezclaron el plásmido parental y el inserto en una proporción 1:3 con 1U de T4 DNA ligasa ( Gibco ) y 2  $\mu$ l del amortiguador de la enzima ( 5x ) ajustando con un volúmen final de 20  $\mu$ l. La mezcla se colocó a una temperatura de 15°C toda la noche.

#### **8.8. Transformación de bacterias**

200 ml de una suspensión bacteriana de cultivo de *Escherichia coli* DH10B en medio Luria fué cultivada hasta que la densidad óptica ( DO ) del medio alcanzó un valor de 0.6 medida a 600 nm. Las bacterias se centrifugaron 8 min. a 5,000 rpm, el sedimento se resuspendió en una mezcla fría de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, glucosa 50 mM y Tris-HCl 10 mM, pH=7.5. La pastilla bacteriana resultante fué resuspendida en 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM y 10% de glicerol a 0°C, se hicieron alicuotas de 100  $\mu$ l almacenándose a -70°C.

A una alicuota de 100  $\mu$ l le fué adicionado un volúmen de 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación manteniéndose en hielo por espacio de 30 min., al término del cual se sometió a choque térmico 60 segundos a 42°C, y con posterior incubación en hielo 5 minutos. Las bacterias se centrifugaron 5 segundos a 13,000 rpm y el sedimento fué resuspendido en 1 ml de medio SOC ( 250 mM de KCl, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, triptona 2 gr, extracto de levadura 5gr y glucosa 20 mM, pH=7.0 ) e incubándose 1 hr a 37°C. Por último, 100  $\mu$ l de la suspensión fueron utilizados para sembrar una caja con agar Luria suplementado con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina.



### **8.9. Identificación de colonias transformadas**

Las colonias fueron seleccionadas por su crecimiento en medio Luria suplementado con ampicilina. Las colonias resistentes fueron cultivadas en 3 ml de medio Luria, se cosecharon y lavaron una vez con PBS-Tween; posteriormente se realizó una minipreparación para extracción de ADN plasmídico.

### **8.10. Obtención de ADN plasmídico en pequeña escala por la técnica Mini-prep**

A la pastilla bacteriana se adicionaron 200  $\mu$ l de TELT ( Tritón X-100 0.4%, EDTA 62.5 mM, LiCl 2.5 M y Tris-HCl 50 mM, pH=8.0 ) y 20  $\mu$ l de lizosima ( 10 mg/ml ) disuelta en TELT; la mezcla se agitó vigorosamente en un vortex y fué sometido a ebullición durante 10 segundos, seguido de incubación en hielo por 5 min. y centrifugación po 8 min. a 14,000 rpm. El sobrenadante de lisis se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el ADN plasmídico con 100  $\mu$ l de isopropanol frío; las muestras se centrifugaron 5 min. y el precipitado se lavó con etanol al 70% una vez.

### **8.11. Expansión y obtención de ADN plasmídico en grandes cantidades mediante Midi-prep**

Se inocularon 5 ml de una suspensión bacteriana de cultivo en 500 ml de medio Luria suplementado con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina y se crecieron por espacio de 8 hrs / 37°C, a 200 rpm. La cosecha se realizó centrifugando 10 minutos a 5000 rpm, y la pastilla fué sometida a 2 lavados con SSI. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1.5 ml de glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7.6, EDTA 10 mM, después se adicionaron 6 ml de una solución de 10 mg / ml de lizosima disuelta en solución TE ( Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1mM pH 8 ) y 15 ml de una solución de SDS al 1% y NaOH 0.2 M, mezclando y dejando incubar 10 minutos en hielo; al finalizar la incubación se adicionaron 11.25 ml de una solución 3M de acetato de potasio/5M de ácido acético, seguida de incubación en hielo por 10 min. La mezcla de reacción fué centrifugada 10 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se filtró a través de gasa estéril y se adicionaron 15 ml de isopropanol manteniendola en hielo durante 5 minutos. La suspensión nuevamente centrifugada 5 minutos a 5000 rpm se decantó y el precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de TE y 2 ml de LiCl, seguido de una incubación en hielo por 30 min. y la posterior centrifugación 10 min / 1000 rpm. El sobrenadante obtenido en el paso anterior se transfirió a un tubo limpio al que se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se incubó por espacio de 1 hr / -20°C y centrifugándose 10 min. a 5000 rpm. Al sedimento resuspendido en 500  $\mu$ l de agua inyectable le fué adicionado 100  $\mu$ l de una solución de 10  $\mu$ g / ml de RNAsa (SIGMA ) seguida de una incubación a 37°C / 1 hr, y la posterior adición de 600  $\mu$ l de una solución de cloroformo-álcohol isoamílico ( 24:1 ), mezclándose

vigorosamente y centrifugando durante 2 minutos a 13.000 rpm. una vez separada la fase acuosa se sometió dos veces más al mismo tratamiento y se mezcló con una solución de acetato de sodio 3M pH 7.0 ( en una relación 1 / 10 ), distribuyéndose en tres tubos eppendorf a los que fué adicionado etanol absoluto. Las muestras colocadas a -70°C toda la noche se centrifugaron a 13,000 rpm / 15 min. a 4°C; el sedimento se lavó con 750 µl de etanol al 70%, concentrándose durante 5 min. en una centrífuga con vacío ( HETO ). El ADN de cada tubo fué resuspendido en 200 µl de agua inyectable y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm.

#### **8.12. Purificación de ADN plasmídico por gradiente de densidad en Cloruro de Cesio**

Una vez obtenida la pastilla de ADN plasmídico se resuspendió en buffer TE y a la solución fué adicionado cloruro de cesio a una concentración de 1gr por mililitro de solución de ADN, y 1.8 ml de bromuro de etidio ( 10mg/ml ); la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 15000 rpm con el fin de eliminar el remanente de proteína. Posteriormente la solución se transfirió a tubos de ultracentrífuga de 5ml; la banda de ADN plasmídico se obtuvo por centrifugación a 45000 rpm durante 16 hrs a 20°C. La recuperación de la banda correspondiente al ADN plasmídico se realizó con la ayuda de una jeringa de 3 ml, y eliminación del bromuro de etidio por repetidas extracciones con volúmenes iguales de alcohol isoamílico hasta que se obtuvo una solución transparente que posteriormente fué dializada contra Tris pH=7.4.

#### **8.13. Purificación y caracterización de la porina OmpC recombinante**

Las porinas son obtenidas por el método descrito previamente. Después de obtener la membrana celular, las porinas se solubilizan en Tris-HCl 50 mM, pH7.7 conteniendo 20% de SDS, EDTA 5mM, NaCl 0.4M y 0.05% de β -mercaptoetanol, por espacio de 2 hrs a 37°C; la purificación se realiza por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200. La fracción que contiene a las porinas se dializó contra Tris-HCl 0.5mM, pH7.4 y se precipitó con acetona.

La concentración de proteínas se mide por el método descrito por Lowry ; mientras que la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE ) se lleva a cabo en condiciones reductoras empleando un sistema de amortiguadores discontinuos en una unidad vertical ( LKB Instruments ) como describe Laemli.

#### **8.14. Esquema de Inmunización**

Grupos de tres ratones Balb/c hembras de 4-6 semanas se inmunizaron cuatro veces con las construcciones de ADN plasmídico ( pFM-L-ompC y pFM-ompC ) y el vector pFM92.1, en el cuadriceps de los animales a intervalos de dos

semanas con 100 µg de ADN plasmídico. Los grupos control se trabajaron bajo el mismo esquema administrándoseles OmpCr y solución salina isotónica

\*\* Cinco días antes de la primera inmunización una mezcla de 100 µl hidroclicloruro de bupivacaína al 5% y metil parabenol al 1% fué inyectada en el mismo sitio de la inmunización

\*\* Los ratones inmunizados con ADN plasmídico fueron inoculados con una dosis de 400 µg totales

#### **8.15. Determinación de anticuerpos mediante ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)**

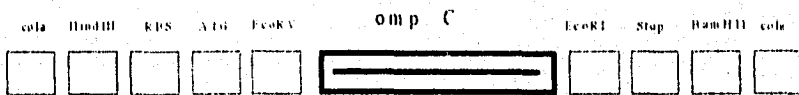
Los anticuerpos anti-OmpC se determinaron mediante la técnica de ELISA. Las placas de microtitulación ( NUNC ) se recubrieron con 100 µg/pozo de una solución de OmpCr (10 µg/ml) en buffer de carbonatos pH 9.6 por 1hr/37°C y toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0.1% y la placa fué bloqueada con leche al 5% en PBS durante 2 hrs a 37°C. Los sueros problemas y el control se colocaron en la placa en diluciones de 1:20 a 1:2560 y 1:100 respectivamente en leche al 5% - PBS y se incubaron 2hrs/37°C. La placa nuevamente se trató con solución de lavado y fué puesta en incubación con una dilución de 1:1000 de suero polivalente anti-ratón conjugado con peroxidasa por 1hr/37°C. El exceso de conjugado se removió mediante lavados con la solución ya mencionada para la posterior adición del sustrato de la peroxidasa ( orto - fenilendiamina ) a cada pozo de la placa de reacción. La reacción que se llevó a cabo entre la enzima y el sustrato se paró después de 10 minutos con ácido sulfúrico 2N. La determinación de la densidad óptica a 490 nm se realizó en un lector semiautomático de ELISA Biomek 1000 ( Beckman Inst )

## IX. RESULTADOS

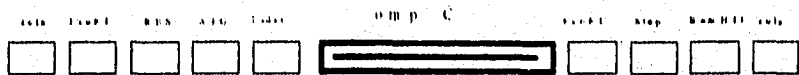
### 9.1. Amplificación del gene *ompC*

A partir de *E. coli* pST13 se amplificó el gene estructural de la porina *OmpC* de *S. typhi* mediante PCR utilizando oligos diseñados en base a la secuencia del gene.

#### a) *ompC* de *S. typhi*



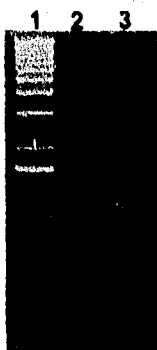
#### b) L-*ompC* de *S. typhi*



**Figura 4. La amplificación del gene que codifica para la proteína *OmpC* de *S. typhi* generó dos genes sintéticos. Ambos contienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en sus extremos, así como sitios propios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación. (a) Representa el gene de *ompC* carente de secuencia líder. (b) Corresponde al gene L-*ompC* que incluye a la secuencia del péptido líder**

## 9.2. Verificación de la existencia de los genes ompC y L-ompC por electroforesis en gel de agarosa

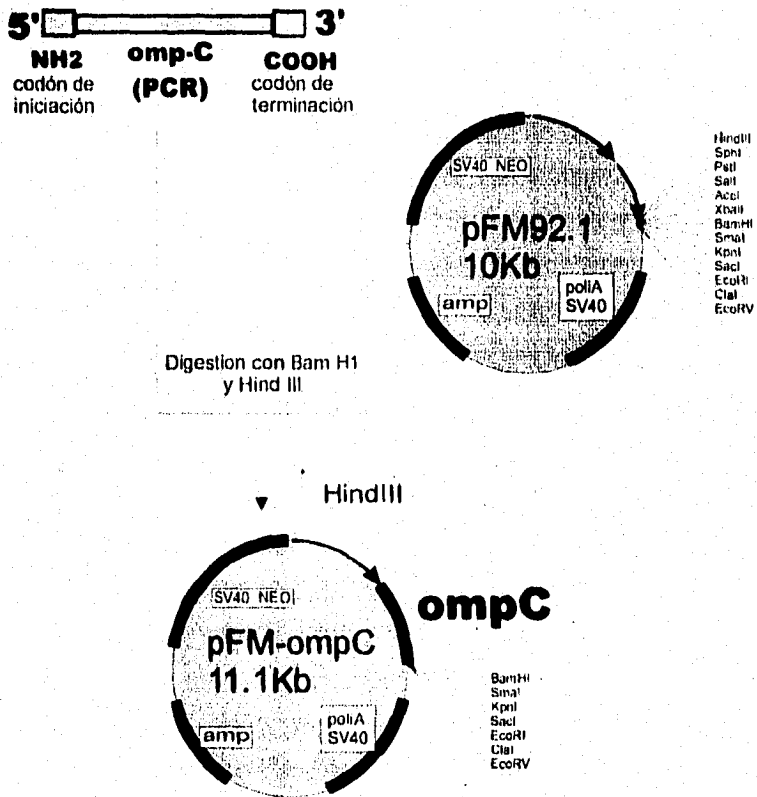
La presencia de los productos de reacción fué evaluada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, el corrimiento se realizó a 77 volts durante 45 minutos.



**Figura 5. Genes sintéticos ompC y L-ompC productos de PCR.** Al reaccionar 100 ng de ADN template de pST13 con 48 pg de cada uno de los iniciadores, 0.2 mM de DNTP's, 1.3 mM de  $MgCl_2$ , 0.16U de Taq DNA polimerasa, 15 ul de buffer para la enzima y ajustando a un volúmen final de 100 ul con agua inyectable; la mezcla de reacción se colocó en un termociclador (Perkin-Elmer 9600) donde se sometió a ciclos de calentamiento, amplificación y terminación. El patrón electroforético de los productos al ser comparado con el estándar (carril 1) de 1 Kb DNA Ladder (Gibco, BRL) muestra dos bandas, una de ellas con un tamaño aproximado de 1.1 Kb (carril 2) corresponde a la ompC sin líder; la segunda banda (carril 3) con un peso de 1.3 Kb representa al gen L-ompC.

### 9.3. Construcción del vector pFM-ompC

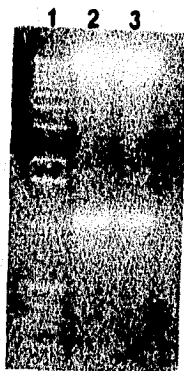
El gene *ompC* así como el plásmido parental se sometieron a digestión con endonucleasas de restricción y los fragmentos de interés purificados por Gene-clean fueron circularizados utilizando la enzima T4 DNA ligasa.



**Figura 6.** La clonación del gene *ompC* sin secuencia líder en el vector eucariote originó el plásmido pFM-ompC. Una orientación adecuada del inserto en los sitios de restricción HindIII y BamHI se traduce en un producto cuyo peso aproximado es de 11.1Kb y que corresponde al plásmido pFM-ompC.

#### 9.4. Identificación del gene *ompC* sin secuencia líder en el vector pFM-*ompC*

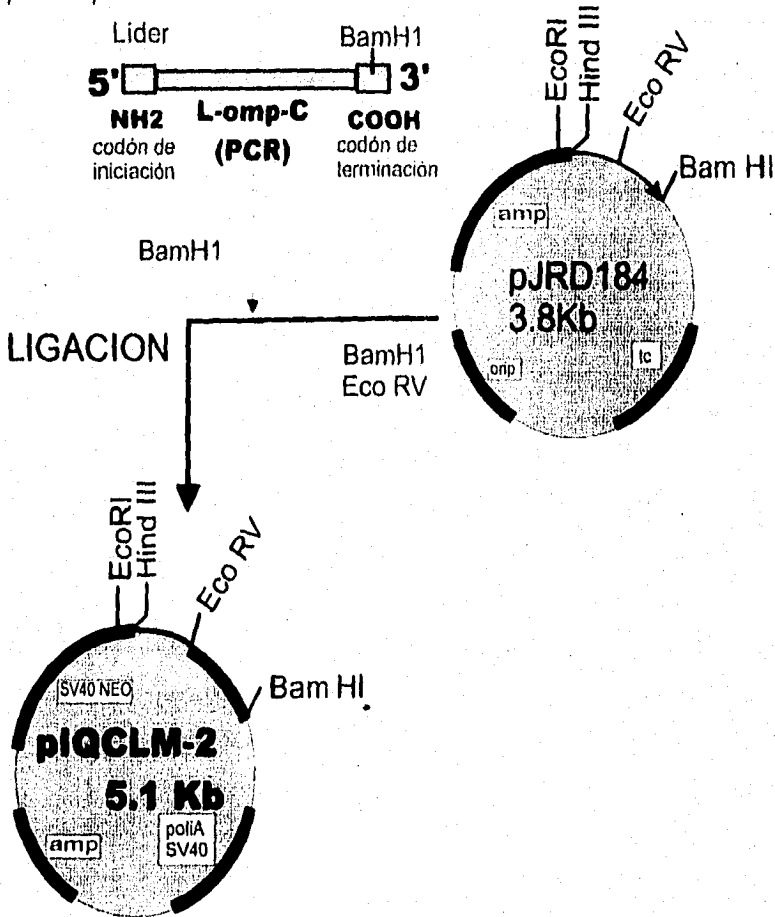
Una vez que se llevó a cabo la clonación de *ompC* en el vector eucariote pFM92.1, fué necesario transformar la cepa *E. coli* DH10B utilizando 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación y cultivar la bacteria en agar Luria suplementada con ampicilina. Las colonias resistentes al antibiótico fueron crecidas en 3 ml de medio Luria conteniendo 50  $\mu$ g / ml de penicilina para la extracción e identificación del gene en dicha construcción.



**Figura 7. Electroforésis en gel de agarosa que verifica la presencia del gene *ompC* sin líder en el plásmido pFM-*ompC*.** El corrimiento electroforético del producto de la clonación del inserto *ompC* en el plásmido parental y digerido con la enzima de restricción *EcoRV* generó dos fragmentos (carril 2 y 3), el que se localiza en la parte superior del gel con un tamaño aproximado de 10 Kb corresponde al vector, mientras que la parte inferior presenta un fragmento de 1.1 Kb correspondiente al gene *ompC* sin líder. (Carril 1: marcadores de 1 kb). Resultados similares se obtienen cuando el plásmido es digerido con las enzimas *Hind III* y *BamHI*; por otro lado un producto linealizado con un tamaño aproximado de 11 Kb es el resultado de la digestión del plásmido con la enzima *EcoRI*.

### 9.5. Construcción del plásmido pIQCLM2 que presenta al gene *ompC* con la secuencia del péptido líder

Una clonación previa del gene *ompC* con la secuencia del péptido líder en el plásmido pJRD184 fué necesaria para que el inserto adquiriera los sitios de restricción adecuados que permitieran la posterior subclonación en el plásmido parental pFM92.1



**Figura 8. Clonación del gene *L-ompC* en el plásmido pJRD184.** La clonación del inserto *L-ompC* en los sitios de restricción EcoRV y BamHI del pJRD184 y en la orientación adecuada genera un producto de 5.1 Kb al que se denominó pIQCLM2 como se muestra en el esquema.



### 9.6. El corrimiento electroforético permitió evidenciar la presencia de L-ompC en el plásmido pIQCLM2

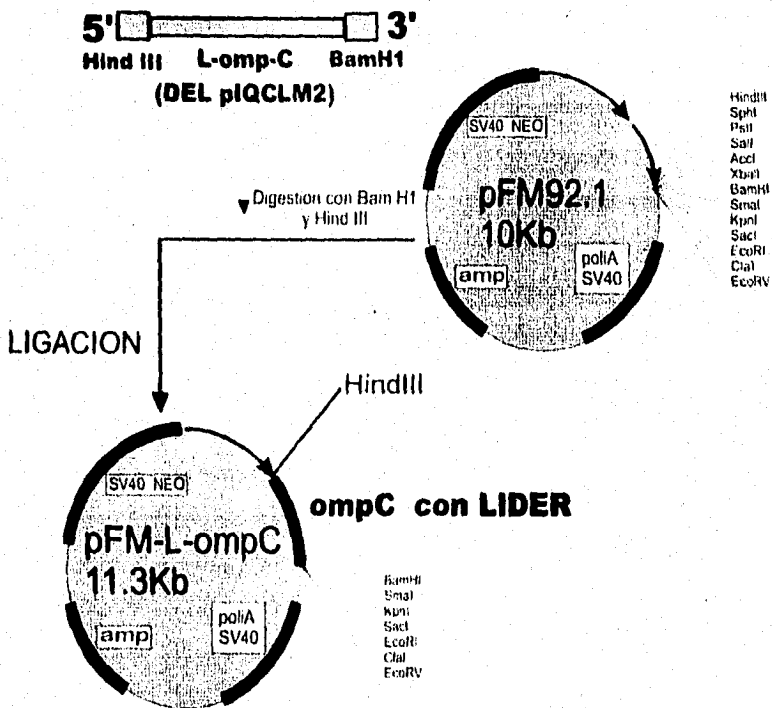
La digestión de L-ompC con la enzima de restricción Bam HI y del plásmido pJRD184 con Bam HI y Eco RV permitió la purificación de los fragmentos por Gene-clean para la posterior ligación y transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$  FIQ. Las colonias seleccionadas por su resistencia al antibiótico presente en el medio de cultivo fueron crecidas nuevamente en caldo Luria suplementado con ampicilina y la extracción del ADN plasmídico mediante minipreparación permitió corroborar la presencia del inserto en un gel de agarosa.



**Figura 9. Digestión con endonucleasas de restricción del plásmido pIQCLM2.** El análisis con enzimas de restricción de los plásmidos pJRD184 y pIQCLM2 permite distinguir en un gel de agarosa los productos de la digestión con BamHI y HindIII: (carril 1) marcadores de 1Kb, (carril 2) banda de 3.8 Kb que corresponde al plásmido pJRD184; (carril 3) se observa la presencia de una banda en la parte superior del gel con un tamaño aproximado de 3.8 Kb correspondiente al vector, mientras que una segunda banda inferior de 1.3 Kb corresponde al L-ompC; lo que demuestra que la clonación se realizó en los sitios elegidos y con la orientación adecuada.

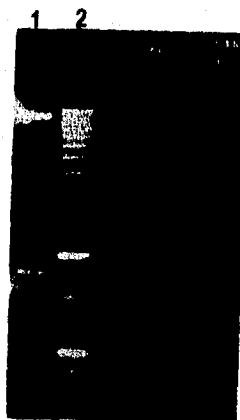
### 9.7. Construcción del vector pFM-L-ompC.

La clonación de L-ompC en el plásmido pJRD184 permitió que el gene que codifica para la proteína Ompc de *S. typhi* portando la secuencia del péptido líder adquiriera en el plásmido pIQCLM2 los sitios de restricción Hind III y Bam HI necesarios para insertarse en forma correcta en el vector eucariote.



**Figura 10.** La clonación de L-ompC proveniente del plásmido pIQCLM2 en el vector de expresión pFM92.1 originó el plásmido pFM-L-ompC. El producto obtenido de la clonación del inserto en el plásmido parental orientado a los sitios de restricción BamHI y HindIII presentó un tamaño aproximado de 11.3 Kb como se indica en la figura.

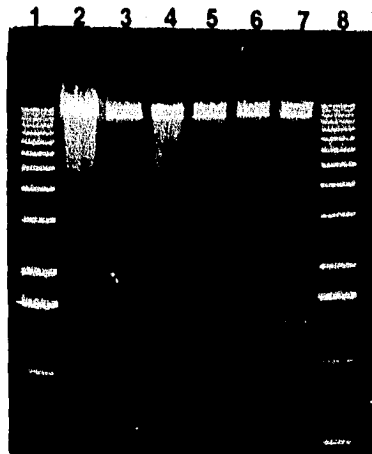
**9.8. La presencia del gene L-ompC fué evidenciada por la digestión y corrimiento electroforético del plásmido pFM-L-ompC**



**Figura 11. Análisis del plásmido pFM-L-ompC después del tratamiento con endonucleasas de restricción.** La electroforésis en gel de agarosa muestra dos fragmentos que resultan de la digestión con las enzimas de restricción Eco RV y Hind III: (carril 1) un fragmento de aproximadamente 10 Kb localizado en la parte superior del gel corresponde al pFM92.1; mientras que el fragmento del extremo inferior con un tamaño de 1.3 Kb corresponde al gene L-ompC. Un producto linearizado con un tamaño de 11.3 Kb se obtiene después de la digestión con la enzima Eco RI.

### 9.9. Purificación de las construcciones de ADN plasmídico mediante gradiente de densidad en Cloruro de Cesio

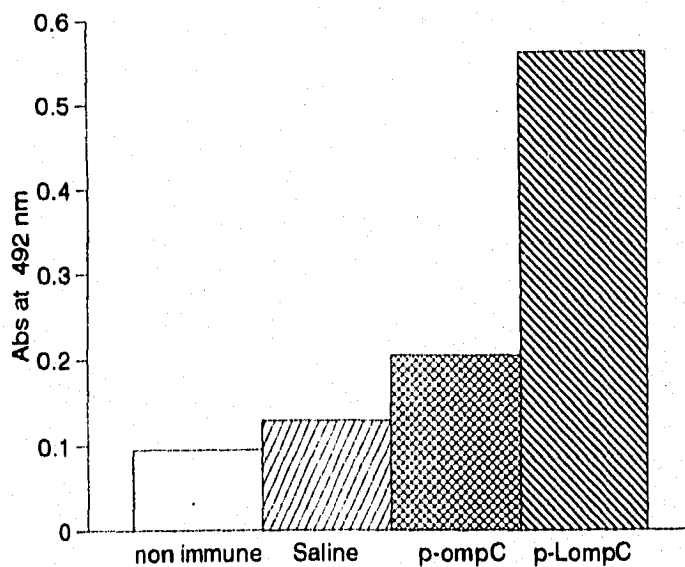
Después de realizada la obtención de ADN plasmídico de las construcciones y el vector blanco en gran escala ( Midi-prep ), una purificación posterior con el propósito de eliminar el remanente de proteína se efectuó mediante la adición de cloruro de cesio a una concentración de 1 gr / ml de solución de ADN plasmídico y bromuro de etidio 10 mg / ml. La banda de ADN plasmídico se obtuvo por centrifugación a 45,000 rpm / 16 hrs a 20°C, la que fué recuperada y separada del bromuro de etidio por repetidas extracciones con volúmenes iguales de alcohol isoamílico hasta obtener una solución transparente que se dializó contra Tris pH 7.4



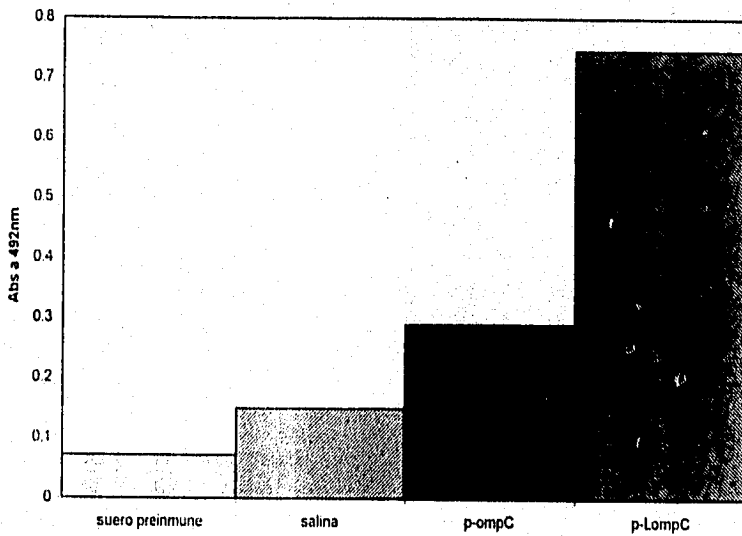
**Figura 12. Electroforésis en gel de agarosa de las construcciones después de su purificación por gradiente de cloruro de cesio. ( Carril 1y 8 ) marcadores de 1 Kb, ( carril 2 y 3 ) plásmido pFM92.1 digerido con Eco IR, las bandas muestran un producto de aproximadamente 10 Kb;( carril 4 y 5 ) vector pFM-ompC digerido con Eco RV, la banda superior tiene un tamaño de 10 Kb, mientras que la inferior es un producto de 1.1 Kb que corresponde al gene ompC sin líder; ( carril 6 y 7 ) vector pFM-L-ompC digerido con Eco RV - Hind III, el fragmento localizado en la parte superior del gel representa al vector blanco ( 10 Kb ) y el fragmento inferior corresponde al inserto L-ompC ( 1.3 Kb ).**

### 9.10. La inmunización con ADN plasmídico induce anticuerpos de tipo IgG contra la porina OmpC de *Salmonella typhi* en ratones

Dos semanas después de finalizado el esquema de inmunización se determinó la reactividad de los sueros por ELISA empleando como antígeno OmpC recombinante.



**Figura 13. Reconocimiento de la porina OmpC recombinante por el suero de los ratones inmunizados con las construcciones de ADN plasmídico.** Los sueros provenientes de ratones inmunizados con 400  $\mu$ g totales de las construcciones pFM-ompC y pFM-L-ompC son capaces de generar anticuerpos que reconocen de manera específica a la porina OmpC recombinante de *S. typhi* mostrando un título tres veces mayor aquellos provenientes de ratones tratados con el plásmido que porta a la secuencia del péptido líder.



**Figura 14.** Los anticuerpos anti-Ompc muestran gran afinidad por el **antígeno**. Los ratones inmunizados con las construcciones de ADN plasmídico son capaces de producir anticuerpos específicos y de alta afinidad, ya que al aumentar la astringencia de la solución de lavado a 0.3 M NaCl 0.3 M el título de los sueros no presentan modificación alguna por este tratamiento al comparar los resultados con los obtenidos mediante la ELISA normal ( figura 13 ).

## X. DISCUSION

La prevención de la morbilidad y mortalidad causadas por las enfermedades infecciosas constituye un factor primordial para el desarrollo de vacunas, por lo que resulta necesario conocer los mecanismos de patogenicidad y virulencia del microorganismo.

Con los adelantos de la ingeniería genética y biología molecular se han desarrollado nuevas estrategias para la elaboración de vacunas que se basan principalmente en la clonación de genes en vectores de expresión, conjugación química de antígenos, vectores bacterianos o virales vivos o atenuados utilizados como acarreadores de microorganismos patógenos y recientemente aquellas que emplean como inmunógeno ADN plasmídico permitiendo que las células del huésped produzcan a la proteína codificada y la presenten más fácilmente al sistema inmune. ( **Vacunas de Cuarta Generación o Vacunas de ADN plasmídico** )

Estudios realizados para conocer el tipo de respuesta inmune generada durante la infección por *Salmonella* revelan que las porinas juegan un papel relevante como agente inmunogénico al demostrar en un modelo de ratón que preparaciones de porinas, así como la OmpC recombinante<sup>62,63</sup> inducen un estado de protección que involucra respuesta de anticuerpos y la activación específica de linfocitos T. Estos resultados permiten que las porinas de *S. typhi* se tomen en cuenta para ser un buen candidato a vacuna; sin embargo, su manipulación se dificulta por ser una proteína altamente hidrofóbica y la limitante principal para producirla a nivel industrial radica en que las preparaciones de porinas obtenidas por los métodos bioquímicos convencionales presentan contaminación por lipopolisacárido (LPS) aún después de ser purificadas, es por ello que la inmunización con ADN representa una alternativa para eliminar los problemas que implica el desarrollo de una vacuna confiable y eficaz para el tratamiento de la Fiebre tifoidea.

En el presente trabajo se describe el uso de ADN plasmídico que codifica para la porina OmpC de *S. typhi* capaz de inducir en ratones la producción de anticuerpos específicos contra dicha proteína como respuesta posterior a la inmunización con el material genético.

A partir de *E. coli* UH302 pST13 se amplificó el gene estructural de la porina OmpC de *S. typhi* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligos diseñados tomando en cuenta la parte amino terminal de la forma madura de la OmpC con la secuencia del péptido líder y sin ésta; los genes sintéticos denominados ompC (sin líder) y L-ompC (con líder) presentan sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, así como sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y terminación. (Figura 4, 5)

Para desarrollar nuestro sistema de expresión de genes se eligió el vector de expresión eucariote pFM92.1 bajo el promotor de  $\beta$ -actina que cuenta con un tamaño de 10 Kb, el plásmido incluye múltiples sitios de clonación, el gene de resistencia a la ampicilina y el gene de resistencia a neomicina controlador por el promotor eucariote SV40.

La inserción de las secuencias genómicas (ompC y L-ompC) de manera independiente en los sitios Hind III y BamHI del plásmido parental se realizó recuperando los fragmentos de interés purificados a partir de un gel de agarosa y circularizados con la enzima T4 DNA ligasa para la transformación de *E. coli* DH10B con los productos de la clonación de ambos genes. Las colonias transformantes que fueron resistentes a la ampicilina en agar Luria fueron seleccionadas y cultivadas individualmente en medio Luria suplementado con 50 µg/ml de ampicilina para identificar a los plásmidos mediante extracción en pequeña escala del ADN.

El análisis con la enzima de restricción Eco RV en el plásmido que contiene a la ompC sin líder revela dos productos en un gel de agarosa, uno de ellos con un tamaño de 10 Kb corresponde al vector pFM92.1 y el segundo de aproximadamente 1.1Kb representa al gene ompC; la digestión con Eco RI se traduce en un producto linearizado de 11.0Kb resultado de la clonación de los fragmentos de 10 y 1.1 Kb. plásmido que se nombró **pFM-ompC**. (Figura 6, 7 ).

Debido a que el gene sintético L-ompC no presentaba los sitios de restricción adecuados para insertarse en el plásmido parental, la clonación previa en el plásmido pJRD184 en los sitios Eco RV - Hind III generó el producto pQCLM2 de 5.1 Kb (Figura 8, 9 ) conteniendo un fragmento de 1.3 Kb obtenido por la digestión con BamHI - Hind III y que fue subclonado en el vector eucariote para generar el plásmido **pFM-L-ompC** con un tamaño de 11.3 Kb, resultados que se observan en (Figura 10, 11 ). La digestión con las enzimas EcoRI - HindIII muestra en un gel de agarosa un producto cuya banda superior de aproximadamente 10 Kb corresponde al vector, mientras que la banda inferior de 1.3 Kb representa al gene L-ompC; un fragmento lineal se obtuvo de la digestión con Eco RI y NdeI.

Así, el patrón electroforético en gel de agarosa de las construcciones de ADN plasmídico a través de los cortes con enzimas de restricción comprueba que los genes sintéticos ompC y L-ompC se clonaron debidamente en los sitios planeados y en la orientación adecuada al promotor SV40 del vector de expresión eucariote pFM92.1.

Se ha demostrado previamente en diversos sistemas que la inoculación intramuscular de vectores plasmídicos bajo el control de un promotor apropiado induce una respuesta inmune específica del antígeno codificado, y que el pretratamiento con una solución al 0.5% de hidrocloreuro de bupivacaína<sup>44</sup> cinco días antes de la inoculación de ADN plasmídico, promueve la transferencia de genes presumiblemente por el incremento de células mitóticamente activas como resultado de la regeneración muscular de las mismas debido a la acción farmacológica del anestésico. Lo anterior se comprobó en nuestro sistema cuando se realizó la titulación del suero preinmune y de los obtenidos una vez completado el esquema de inmunización con cada construcción del material genético; los ratones inmunizados con los plásmidos pFM-ompC y pFM-L-ompC presentan anticuerpos contra la porina OmpC recombinante de *Salmomella typhi* (Figura 13 ), estos anticuerpos son específicos y presentan alta afinidad por el antígeno lo que se comprobó cuando la astringencia de la solución de lavado



aumentó a 0.3M de NaCl, indicando maduración de la respuesta de células B posterior a la inoculación de ADN plasmídico (Figura 14 ). Con esto también se confirma que la dosis de 400 ug totales utilizados en el esquema de inmunización fué suficiente para inducir respuesta inmune específica en los ratones.

Por otra parte, los resultados muestran que el título de anticuerpos desarrollado por los ratones inmunizados con el plásmido que porta la secuencia del péptido líder de la *OmpC* de *S. typhi* es tres veces mayor al obtenido en el suero de ratones inoculados con el plásmido carente de dicha secuencia, sugiriendo que el plásmido con la secuencia líder es secretado al medio o depositado en la membrana debido a la presencia de dicha señal, mientras que el plásmido sin la secuencia líder permanece en citoplasma.

Diversos estudios han demostrado que la secuencia líder no forma parte de la proteína madura pero es capaz de introducir la proteína a la membrana, la consecuencia intrínseca de esta interacción es el paso de la proteína dentro del compartimento a otro sitio de localización. Las proteínas que residen en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática o que son secretadas por la célula tienen un punto de disparo común para su asociación con la membrana. Las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso poseen la capacidad de pasar del ribosoma directamente a la membrana; de tal modo que en el retículo endoplásmico las proteínas son transferidas al aparato de Golgi y de ahí son dirigidas a su último destino tal como los lisosomas o vesículas secretoras ( esta es la ruta por la cual proteínas tales como las Inmunoglobulinas son secretadas por las células). Lo anterior sugiere que existe una producción superior de la proteína que porta la secuencia líder en el medio extracelular, haciendola más accesibles a las células presentadoras de antígeno y ser procesadas por vía endocítica con la posterior asociación a moléculas de clase II, lo que no sucede con las proteínas que carecen de la secuencia líder de la *OmpC* en los ratones inmunizados con el plásmido pFM-ompC.

Los resultados demuestran que la inoculación de ADN puede ser un método confiable para inducir respuesta inmune específica contra antígenos de *Salmonella typhi* a pesar de que el mecanismo involucrado no esté bien definido. Restarla conocer posteriormente si dicha respuesta es capaz de activar específicamente a los linfocitos T y conferir protección frente al reto contra la bacteria.

## **XI. CONCLUSIONES**

- La inmunización con el gene de la porina OmpC de *Salmonella typhi* induce expresión de la proteína en un modelo de ratón

- La proteína sintetizada "in vivo" es capaz de inducir anticuerpos de tipo IgG en un modelo de ratón

- Una dosis de 400 ug de ADN plásmidico es suficiente para generar respuesta inmune específica

## **XII. PERSPECTIVAS**

La inmunización con ADN puede ser utilizada para inducir un estado de protección contra la infección por *Salmonella*, como una herramienta importante para remover la contaminación por lipopolisacárido en las vacunas de subunidades.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

39

### XIII. REFERENCIAS

1. Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rodhes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993. 259, 1745-1749.
2. Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V., Agadjanyan, M.J., Dnag, k., Rafaelli, Y. et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993. 90. 4156-4160.
3. Wolff, J.A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990. 247, 1465-1468.
4. Acsadi, G., Dickson, G., Love, L.R., Jani, A., Walsh, F. S., Guringhe, A. et al. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991. 352, 815-818.
5. Wolff, J. A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A. And Chong, W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 1991. 11. 474-485
6. Tang, D. C., DeVit, M. and Johnston, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992. 356. 152-154.
7. Robinson, H.L., Hunt, L.A. and Webster, R.G. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993, 11, 957-960.
8. Webster, R. G., Fynan, E. F., Santoro, J.C. and Robinson, H. Protection of ferret against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 1994, 12, 14495-1498.
9. Danko, Y. And Wolff, J.A. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine* 1994, 1499-1502.
10. Davis, H. L., Michel, M. L., Mancini, M., Schleef, M. And Whalen, R. G. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA- based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 1994, 12, 1503-1509.
11. Zhou, X., Berglund, P., Rhodes, G., Jondal, M. And Liljestrom. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine* 1994, 12, 1510-1514.
12. Smith, H.A. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* 1994, 12, 1515-1519.
13. Robertson, J.S. Safety considerations for nucleic vaccines. *Vaccine* 1994, 12, 1526-1528.
14. Cichutek, K. Nucleic acid immunization: a prophylactic gene therapy? *Vaccine* 1994. 12, 1520-1525.
15. Hoffman, S.L., Sedegah, M. And Hedstrom, R.C. Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine* 1994, 12, 1529-1533.
16. Xu, M. And Liew, F.Y. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 1994, 12, 1534-1536.

17. Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Colston, M.J. and Silva, C.L. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 1994, 12, 1537-1540.
18. Ulmer, J.B., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Donnelly, J.J. and Liu, M.A. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 1994, 12, 1541-1544.
19. Coney, L., Wang, B., Ugen, K.E., Boyer, J., McCallus, D., Srikantan, V. et al. Facilitated DNA induces anti-HIV-1 immunity in vivo. *Vaccine* 1994, 12, 1545-1550.
20. Waine, G.J. Nucleic Acid Vaccines. *Parasitology Today* 1994, 12, 453-454.
21. Xiang, Z. and Hildgund, C.J. Manipulation of the immune response to a plasmid encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 1995, 2, 129-135.
22. Montgomery, D.L., Leander, K. R., Shiver, J.W., Perry, H.C., Friedman, A., Martínez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. and Liu, M.A. Nonreplicating DNA vectors designed to generate heterologous and homologous protection against influenza A. *Vaccines 94*. Copyright 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 61-64.
23. Haynes, J.R., Einsenbraun, M.D. and Fuller, D.H. Gene-gun mediated DNA immunization elicits humoral, cytotoxic and immunity responses. *Vaccines 94*. Copyright 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 65-70.
24. Donnelly, J.J., Friedman, A., Montgomery, D., Shiver, J.W., Leander, K.R., Perry, H., Martínez, D., Ulmer, J.B. and Liu, M.A. Polynucleotide vaccination against Influenza. *Vaccines 94*. Copyright 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 55-59.
25. Agadjanyan, M.G., Wang, B., Ugen, K.E., Villafana, T., Merva, M., Petrushina, I., Williams, W.V. and Weiner, D.B. DNA inoculation with an HTLV-1 envelope DNA construct elicits immune responses in rabbits. *Vaccines 94*. Copyright 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 47-53.
26. Abai, A.M., Rundell, A.K., Margalith, M., Morrow, J., Parker, S.E. and Rhodes, G.H. Coinjection of the genes for interleukin-2 and antigen does not increase the immune response. *Vaccines 94*. Copyright 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 77-81.
27. Raz, E., Carson, D.A., Rhodes, G.H., Abai, A.M., Felgner, L.F. and Baird, S.M. Cationic lipids inhibit intradermal genetic vaccination. *Vaccines 94*. Copyright 1994. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 71-75.
28. Dai, Y., Roman, M., Naviaux, R.K. and Verma, I.M. Gene therapy via primary myoblasts: Long-term expression of factor IX protein following transplantation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 10892-10895.
29. Miura, T. and Mizushima, S. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplasts of *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Acta*. 1968, 150, 159-161.
30. Schnaitman, C.A. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. *J. Bacteriol.* 1971, 108, 545-552.

31. Schnaitman, C.A. Examination of the protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 1970, 104, 882-889.
32. Bragg, P.D. and Hoy, C. Organization of protein in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1972, 274, 478-488.
33. Schnaitman, C.A. Outer membrane proteins of *Escherichia coli* O 111 outer membrane consist of four distinct polypeptide species. *J. Bacteriol.* 1974, 442-453.
34. Schmitges, C.J. and Henning, U. The major proteins in the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. *Eur. J. Biochem.* 1976, 63, 47-52.
35. Di Rienzo, J., Nakamura, K. and Inouye, Y. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis assembly and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 1978, 47, 481-532.
36. Osborn, M.J. and Wu, H.C. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 1980, 34, 369-422.
37. Nikaido, H. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Meth. Enzymol.* 1983, 97, 85-100.
38. Nikaido, H. and Vaara, M. Outer membrane. En: Neidhardt, F.C., Ingraham, J., Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (Eds) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA. 1987, 7-22.
39. Braun, V. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1975, 335-337.
40. Nikaido, H. Porin and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *Biol. Chemistry.* 1994, 269, 3905-3908.
41. Cowan, S.W. and Rosenbusch, P. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science.* 1994, 264, 914-916.
42. Cowan, S.W., Schjirmer, G., Rummel, G., Steelert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A. and Rosenbusch, J.P. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature.* 1992, 358, 727-733.
43. Nikaido, H. and Vaara, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 1985, 49, 1-32.
44. Stock, J.B., Ninfa, A.J. and Stock, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. 1989, 53, 450-490.
45. Wang, L.T. and Frash, C.E. Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 1984, 46, 408-414.
46. Buchanan, T.M., Pearce, G.K. and Arko, R.J. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane proteins complex and purified pill. *J. Infect. Dis.* 1977, 136, 132-137.
47. Guilleland, H.E., Parker, M.G., Matthews, J.W. and Berg, R.D. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect. Immun.* 1984, 44, 49-54.

48. Kussi, N.I., Nurmien, M., Saxen, H. And Mákela, P.S. Immunization with major outer membrane protein ( porin ) preparations in experimental murine Salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1981, 34, 328-332.
49. Svenson, S.B., Nurmien, B.M. and Lindberg, A.A. Artificial Salmonella vaccine: O-antigenic oligosaccharide protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1979, 25, 863-872.
50. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., González, C., Moreno, J. and Kumate, J. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9, 12, Vi: d. *Infect. Immun.* 1988, 56, 2953-2959.
51. Ortiz, V., Isibasi, A., García-Ortigoza and Kumate, J. Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with Typhoid Fever. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 1640-1645.
52. Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C., García, A. And Kumate, J. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porin. *Vaccine.* 1992, 10, 811-813.
53. González, C., Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., García, A., Blanco, F. And Kumate, J. Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from *Salmonella*. *Microbiol. Immunol.* 1993, 37, 793-799.
54. Blanco, F., Isibasi, A., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C. and Kumate, J. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1990, 25, 73-80.
55. Hoop, T.P. and Woods, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981, 78, 3824-3828.
56. Bairoch, A. PCGENE: The nucleic acid and protein sequence analysis software system. (TM) IntelliGenetics Inc. University of Genova, Switzerland.
57. Orozco, M. Péptidos sintéticos de porinas de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. 1992. México, D.F
58. López-Santibáñez, G. M. Caracterización inmunoquímica de dos epitopos de la porina OmpC de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. Fac. De Química, UNAM. 1993.
59. Paniagua, J., Sánchez, J., Ramírez, G., Isibasi, A. and Kumate, J. Genetic construction of a hybrid protein containing a *Salmonella typhi* OmpC porin epitope. *Arc. Med. Res.* 1992, 200.
60. Barry, Michel. A; Barry, Mary. E. and Jonshon, Stephens, A. Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. ( Short Technical Reports ). *Biotechniques*, 1994, 16. 616-618
61. J. Agüero, G. Mora, M. J. Mroczenski-Wildney and Cabello, F. *Microb. Pathogen.* 1987, 3, 399-407
62. Venegas, W, Gómez, I. and Yuldelevien, A. The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene. *Nuc. Ac. Res.* 1988, 16, 7721

63. Isibasi, A, Paniagua, J; Rojo, M; Martín, N; Ramírez, G; Gonzáles, C; Macías, C; Sánchez, J; Kumate, J. and Ortiz, V. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity . Ann of the New York Acad. Sci. 1994, 730, 350-353
64. Danko, I; Fritz Jeffrey, D; Jiao, S; Hogan, K. and Wolff, J. Pharmacological enhancement of "in vivo" foreign gene expression in muscle. Gene Therapy. 1994, 1, 114-121.



## Induction of Antibodies against *Salmonella typhi* OmpC Porin by Naked DNA Immunization<sup>a</sup>

C. LÓPEZ-MACÍAS, M. A. LÓPEZ-HERNÁNDEZ,  
C. R. GONZÁLEZ, A. ISIBASI,  
AND V. ORTIZ-NAVARRETE\*

Unidad de Investigación Médica en Inmunología  
Hospital de Especialidades  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS  
P.O. Box 73-032  
México D.F., C.P. 03020

### INTRODUCTION

*Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, only affects humans. However, under certain experimental conditions it is possible to infect animals such as mice, and mimic some aspects of the natural infection enabling the study of the mechanisms of the immune response to the whole bacteria or the identification of protective antigens.<sup>1</sup> Thus, employing the murine model it has been demonstrated that outer membrane proteins (OMPs) isolated from *S. typhi* are able to elicit cellular<sup>2</sup> and humoral immune responses. Moreover, the administration of a mixture of OMPs<sup>3</sup> or porins<sup>4</sup> isolated from *S. typhi* or purified recombinant OmpC<sup>5</sup> induces protection in mice against the challenge with this bacterium. Nevertheless, this model also has other drawbacks. The OMP preparations obtained by conventional immunochemical methods always contain some contaminant lipopolysaccharide (LPS) because these two molecules are tightly associated. Since LPS has biological activities at very low concentrations, it is difficult to define the precise role of each molecule in the protection elicited. The demonstration that naked DNA is able to elicit specific immune response against those proteins it encodes represents an alternative strategy to overcome this problem. Here we report that the inoculation of DNA bearing the *S. typhi* ompC gene in the quadriceps of BALB/c mice induces specific antibody responses against the OmpC protein and, thus, could be used as a model to further analyze the immunological properties of this protein.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Amplification of the ompC Gene*

The *ompC* gene was amplified from the plasmid pST13<sup>6</sup> by polymerase chain reaction (PCR). Two synthetic genes were obtained, one including the leader-peptide sequence, and the other lacking this sequence (Fig. 1).

<sup>a</sup> Part of this work was supported by CONACYT (Grant 264100-5-3937M); C.L.M. received a fellowship from DUIS (DIAFA, UNAM).

\* Corresponding author.



#### Construction of the Plasmid Vectors

The synthetic genes were inserted in the convenient restriction sites of the pFM92.1 expression vector<sup>1</sup> under the  $\beta$ -actin promoter (Fig. 1). The resulting plasmids, p-LompC (with leader), p-ompC (without leader) and the pFN92.1, were purified by  $\text{CsCl}$ .

#### DNA Inoculation

Groups of five BALB/c mice were injected in the quadriceps four times, over two weeks, with 100  $\mu\text{g}$  of the constructs. Five days before the first DNA inoculation, a mixture of bupivacaine hydrochloride and methylparaben was injected in the quadriceps.

#### Purification of Porins

Porins were purified from *S. typhi* 9.12. Virid and recombinant OmpC was purified from *E. coli* UH302-pST113 by sodium dodecyl sulfate (SDS) extraction from bacterial membrane preparations by the method described previously.<sup>14</sup>

#### Specific Antibody Responses

Two weeks after the last injection, the mice were bled and the antibodies against the OmpC porin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot.<sup>1</sup>

### RESULTS AND DISCUSSION

Mice immunized with four doses of p-LompC or p-ompC plasmids presented antibodies against the recombinant OmpC. These antibodies may have high affinity to the porin, since they resisted 0.3 M NaCl washes in the ELISA (Fig. 2), thus indicating that there is maturation of the B cell response after immunization with naked DNA. The titer of antibodies developed by mice immunized with the p-LompC was threefold higher than that obtained by the p-ompC. This may be due to the superior production and/or release of the protein to the extracellular

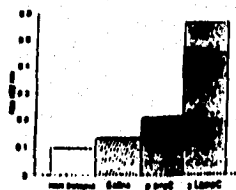


FIGURE 2. Induction of immunoglobulin G (IgG) against *Salmonella typhi* OmpC protein in mice immunized with naked DNA.

environment. Another possibility is that the p-LompC construct could promote cell surface expression of the porin, making it more accessible to the B cells. The Western blot analysis confirmed the antibody response to OmpC, and neither antibodies against LPS nor cross-reacting with other porins was demonstrated. Therefore, DNA inoculation could be an alternative method for the induction of specific immune responses against *S. typhi* antigens. Many questions remain to be answered, such as, which is the mechanism involved in the higher antibody response induced by the vector bearing the leader sequence, whether there is indeed cellular immune response, and whether the immune response is protective. Considering that the current available vaccines against typhoid fever present undesirable side effects due to the contaminant LPS, naked DNA immunization could be explored as an approach in future vaccine development.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Plasmid pST13 was provided by Dr. Felipe Cabelli (Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College, Valhalla, New York). Primers for OmpC amplification were donated from Dr. Fernando Noriega (Center for Vaccine Development, University of Maryland at Baltimore, Maryland). Plasmid pFM92.1 was provided by Prof. Günter J. Hämmerling and Dr. Frank Stomburg (Institute for Immunology and Genetics, German Cancer Research Center, Heidelberg).

#### REFERENCES

1. HIDALGO, A., V. ORTIZ-NAVARRETE, M. VARGAS, J. PANIAGUA, C. R. GUINZALEZ, J. BLANCO & J. KUSIATE. 1988. *Infect. Immunol.* 56: 2933-2939.
2. GONZALEZ, C. R., A. HIDALGO, V. ORTIZ-NAVARRETE, J. PANIAGUA, J. CLARITA, F. BLANCO & J. KUSIATE. 1991. *Microbiol. Immunol.* 37: 791-799.
3. HIDALGO, A., V. ORTIZ-NAVARRETE, J. PANIAGUA, R. PELAYO, C. R. GUINZALEZ, J. A. GARCIA & J. KUSIATE. 1992. *Vaccine* 10: 811-813.
4. HIDALGO, A., J. PANIAGUA, M. P. ROJO, N. MARTIN, G. RAMIREZ, C. R. GUINZALEZ, C. LOPEZ-MOLINA, J. SANCHEZ, J. KUSIATE & V. ORTIZ-NAVARRETE. 1994. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 750: 53-55.
5. AGRESTO, J., G. MORI, M. J. MROZINSKI-WILDEY, M. E. FERNANDEZ-DEBON, L. ADON & F. C. CAPPELLI. 1987. *Microb. Pathog.* 3: 499-507.
6. YANOSKY, A., I. GOMEZ, I. ZARON & A. YUDOFVICH. 1988. *Nucleic Acids Res.* 16: 711-721.
7. MONTBERG, F., V. ORTIZ-NAVARRETE, J. NEFFES, Y. GOMIY, H. SPIES, S. POWIS, D. BLECHER, J. HODGON, P. WALDEN & G. HÄMMERLING. 1992. *Nature* 356: 174-177.