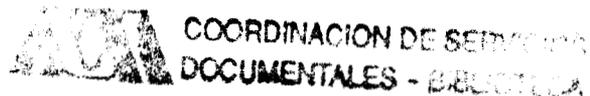


**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**"UTILIZACIÓN DEL AUTOTRANSPORTADOR *MisL* COMO VECTOR  
DE EPITOPOS HETERÓLOGOS EN *Salmonella enterica*"**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOLOGÍA

EXPERIMENTAL PRESENTA :

**MA. DEL ROCIO LEON KEMPIS**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. CESAR R. GONZALEZ BONILLA**

ASESORES:

**DRA. ARACELI E. SANTIAGO MACHUCA**

**M. C. FERNANDO RUIZ PEREZ**

**DR. RUBEN D. MARTINEZ PEREZ**

México, DF.

Mayo de 2001

225720

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I) se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro 309-0.

Se reconoce al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado durante la realización de la maestría, a través de la beca-crédito número 129 730 durante el periodo de Febrero de 1999 a Enero de 2001.

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Lista de Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>Introducción</b>	3
Sistemas de secreción	
Tipo I	3
Tipo II	4
Tipo III	4
Tipo IV	5
Tipo V	6
<b>Justificación</b>	11
<b>Hipótesis</b>	11
<b>Objetivos</b>	
Objetivo General	12
Objetivos específicos	12
<b>Estrategia Experimental</b>	
Materiales y Métodos	
Cepas bacterianas	12
Transformación de <i>Salmonella typhi</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	12
Técnicas de DNA recombinante	13
Fraccionamiento de la bacteria	14
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	15
Inmunoelectrotransferencia	16
Inmunofluorescencia indirecta	16
Citometría de flujo	16
Inmunización de ratones BALB/c	17
Detección de anticuerpos específicos contra NANP por ELISA	17
Evaluación del reconocimiento contra el antígeno nativo en esporozoitos de <i>Plasmodium falciparum</i>	17
<b>Resultados</b>	
<u>I.- Construcción de los plásmidos</u>	
1.1 Obtención del dominio $\beta$ de <i>misL</i> por PCR	21
1.2 Clonación del dominio $\beta$ de <i>misL</i> en el plásmido pnrLTB- <i>Nhe</i> I	22
1.3 Rastreo de clonas acarreadoras del plásmido ligado al oligonucleótido (NANP) <sub>4</sub> sintético	22
1.4 Rastreo de las clonas que reinsertaron el dominio $\beta$ de <i>misL</i>	23
1.5 Caracterización del plásmido por patrón de digestión.	24
<u>II.- Evaluación de la expresión del péptido (NANP)<sub>4</sub> por diferentes ensayos</u>	25
2.1 Evaluación de la expresión del péptido NANP en extractos de proteínas totales	27
2.2 Evaluación de la translocación del péptido NANP al espacio	

periplásmico	28
2.3 Evaluación de la translocación del péptido NANP hacia la membrana externa, mediada por el dominio $\beta$ del autotransportador MisL	29
<u>III.- Expresión del péptido NANP en la superficie de bacterias Gram-negativas por Inmunofluorescencia y Citometría de flujo.</u>	30
3.1 Evaluación de la expresión del péptido NANP en la superficie de bacterias Gram-negativas por Inmunofluorescencia indirecta	30
3.2 Evaluación de la expresión del péptido NANP en la superficie de bacterias Gram-negativas por citometría de flujo	32
<u>IV.-Inmunogenicidad del péptido NANP en la membrana externa de <i>Salmonella typhi</i> CVD908</u>	34
4.1 Evaluación de la respuesta inmune generada por el péptido (NANP) <sub>4</sub> expuesto en la superficie de <i>Salmonella typhi</i>	34
<u>V.- Reconocimiento del antígeno en su forma nativa por los sueros de los ratones inmunizados con la construcción.</u>	35
5.1 Reconocimiento de la proteína circunsporozoítica nativa en la superficie de esporozoitos por los sueros de ratones inmunizados con <i>Salmonella typhi</i> como acarreadora del péptido (NANP) <sub>4</sub>	35
<b>Discusión</b>	36
<b>Conclusiones</b>	40
<b>Referencias</b>	41

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Alineamiento de la secuencia aminoacídica entre AIDA-1 de *Escherichia coli* y MisL de *Salmonella typhimurium*

Figura 2 Estructura hipotética del dominio  $\beta$  del autotransportador AIDA-1

Figura 3 Diagrama esquemático de la construcción de los plásmidos

Figura 4 Amplificación por PCR del dominio  $\beta$  de *misL*

Figura 5 Gel preparativo para la subsecuente ligación con el oligonucleótido sintético (NANP)<sub>4</sub>

Figura 6 Monitoreo de la inserción del oligonucleótido (NANP)<sub>4</sub> en el plásmido pnrLTB

Figura 7 Rastreo de clonas que reinsertan el dominio  $\beta$  de *misL*

Figura 8 Caracterización por restricción del plásmido pnrLTB(NANP)<sub>4</sub> $\beta$ *misL*

Figura 9 Ilustración de los controles bacterianos empleados

Figura 10 Expresión del péptido NANP en extractos de proteínas totales

Figura 11 Expresión del péptido NANP en proteínas de la fracción periplásmica

Figura 12 Expresión del péptido NANP en extractos de proteínas de membrana externa

Figura 13 Expresión del péptido NANP en la superficie de *E. coli* DH5 $\alpha$  por inmunofluorescencia

Figura 14 Expresión del péptido NANP en la superficie de *Salmonella typhimurium* SL3261 por inmunofluorescencia

Figura 15 Expresión del péptido NANP en la superficie de *Salmonella typhi* CVD908 por inmunofluorescencia

Figura 16 Expresión del péptido NANP en la superficie de *E. coli* DH5 $\alpha$  por citometría de flujo

Figura 17 Expresión del péptido NANP en la superficie de *Salmonella typhimurium* SL3261 por citometría de flujo

Figura 18 Expresión del péptido NANP en la superficie de *Salmonella typhi* CVD908 por citometría de flujo

Figura 19 Reconocimiento de la CSP (forma nativa de repetidos NANP) por los sueros de ratones inmunizados

Figura 20 Modelo hipotético de inserción en la membrana del segmento de MisL empleado en este trabajo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LTB	toxina termolábil de <i>Escherichia coli</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
CSP	Proteína circunsporozoítica de <i>Plasmodium falciparum</i>
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohermorrágica
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
DHB	ácido dihidroxibenzoico
BHI	infusión cerebro corazón
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
pM	picomolar
mM	milimolar
$\mu$ M	micromolar
U	Unidades
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ l	microlitro
ng	nanogramo
NANP	peptido de Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina
Pb	Pares de bases
KDa	Kilodaltones
Kb	Kilobase
D.O.	Densidad óptica
xg	gravidades
OMP	Proteínas de membrana externa
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
rpm	revoluciones por minuto
SSI	solución salina isotónica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
pnir	promotor de la nitrato reductasa
AcMo	anticuerpo monoclonal
2A10	anticuerpo monoclonal con especificidad para NANP
CtxB	subunidad B de la toxina colérica

## RESUMEN

El quinto sistema de secreción de proteínas en bacterias gram negativas, también llamado de “autotransportadores”, está constituido por proteínas que presentan tres dominios funcionales: la secuencia señal, el dominio alfa o amino terminal y el dominio beta o carboxilo terminal. Este último dominio es el que tiene la función de autotransportador, ya que transloca el dominio alfa al exterior mediante la formación de un poro en la membrana externa de manera semejante a como se ensamblan las porinas de bacterias gram-negativas. Esta propiedad hace que este sistema de secreción sea considerado como el más sencillo para la exportación de proteínas en bacterias gram-negativas. Se ha propuesto a las proteínas autotransportadoras para translocar péptidos y proteínas heterólogas hacia la membrana externa o al medio extracelular, lo cual se ha demostrado con éxito en *E. coli* con el dominio  $\beta$  de la proteína AIDA (de EPEC) y de la proteasa de IgA (de *Neisseria gonorrhoeae*). En el presente trabajo demostramos el uso de la proteína MisL de *Salmonella typhimurium* (propuesta como el primer autotransportador del género *Salmonella*) como un buen sistema para expresar epítomos inmunogénicos en la superficie de acarreadores vivos. Por homología de la secuencia aminoacídica del dominio carboxiterminal de MisL con AIDA y con apoyo del modelo topológico hipotético de AIDA previamente publicado se predijo la región carboxilo-terminal de MisL necesaria para la formación del poro. La secuencia carboxilo-terminal propuesta como el dominio beta fue fusionada en su extremo amino terminal con 4 repetidos de los aminoácidos NANP de la proteína CSP de *P. falciparum*, que constituyen el epítomo inmunodominante de células B y con la secuencia señal de la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* EPEC (LTBsp). La expresión de esta proteína de fusión fue controlada por el promotor inducible *in vivo* pnir. Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente MisL es un autotransportador y que puede ser empleado para expresar en la superficie de bacterias gram-negativas epítomos inmunogénicos y generar una respuesta inmune humoral contra ellos, dando lugar así a la creación de nuevos sistemas vacunales, de secreción de proteínas de interés biotecnológico y de ensayos de unión ligando-receptor, ya que la proteína acarreadora no altera la conformación de los péptidos dado que los anticuerpos generados contra éstos reconocieron también la proteína CSP nativa en la superficie de esporozoitos de *P. falciparum*.

## INTRODUCCION

Se han descrito cinco sistemas para la secreción de proteínas en bacterias<sup>(1,8)</sup>. Estos sistemas fueron denominados como: sistema de secreción tipo I (ABC-transportadores), de tipo II (sec-dependientes), de tipo III (ejemplificado por los Yops de *Yersinia*), el de tipo IV (cuyo miembro prototipo es VirB de *Agrobacterium tumefaciens*) y el de tipo V, también llamado de autotransportadores.

El término secreción se emplea para describir el transporte activo de proteínas del citoplasma a través de las membranas interna y externa hacia el exterior o hacia la superficie bacteriana. En cambio, la exportación se refiere al transporte de proteínas del citoplasma al espacio periplásmico<sup>(17)</sup>.

### Sistema de secreción de tipo I

El sistema de secreción tipo I se describió por vez primera para la  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli*<sup>(6)</sup> que se codifica en las islas de patogenicidad de la mayoría de cepas de *E. coli* UPEC y en el plásmido pO157 de EHEC O157:H7<sup>(14)</sup>. Este sistema de secreción requiere de tres proteínas: una ATPasa de membrana interna que proporciona energía al sistema (HlyB para la hemolisina de *E. coli*), una proteína de fusión de membranas que cruza el periplasma (HlyD) y la proteína de membrana externa TolC<sup>(43)</sup>. Las proteínas secretadas por este tipo de maquinaria no tienen la secuencia señal clásica amino-terminal que presentan la mayoría de proteínas secretadas, por lo tanto, realizan translocación independiente de la chaperona citoplásmica Sec- y requieren de la asistencia de proteínas accesorias codificadas por genes que están usualmente contiguos a los genes de la proteína estructural<sup>(9, 10)</sup>. Estas proteínas atraviesan completamente las membranas y son secretadas directamente al medio extracelular<sup>(11-12)</sup>. En todos los casos estudiados, el sistema de tipo I se presenta como homólogo del transportador ABC que se cree está involucrado en la mediación de los pasos requeridos para el consumo de energía durante la translocación de la proteína<sup>(13)</sup>. Otros ejemplos de proteínas que se secretan por este sistema son: la adenilato-ciclase de *Bordetella pertusis*, la leocotoxina de *Pasteurella haemolytica* y las proteasas de *P. aeruginosa* y de *Erwinia chrysanthemi*<sup>(14)</sup>. Empleando los conocimientos generados acerca de este sistema de secreción, se han desarrollado herramientas para secretar antígenos recombinantes en el medio externo desde acarreadores bacterianos. Con tal fin, se ha utilizado el operón que dirige la secreción de la hemolisina  $\alpha$  de *E. coli* logrando secretar algunos antígenos recombinantes<sup>(15, 16, 45)</sup> o que adquieran un fenotipo particular<sup>(44)</sup>.

## Sistema de secreción de tipo II.

La vía de secreción tipo II se caracteriza por translocar las proteínas en dos pasos, por una parte las proteínas primero son secretadas dentro del periplasma utilizando la vía *sec*, es decir, las proteínas sintetizadas poseen un péptido señal aminoterminal hidrofóbico de 30 aminoácidos, que se asocia a una chaperona de exportación-específica SecB durante la síntesis de la proteína de exportación<sup>(3)</sup>; subsecuentemente éstas son translocadas a través de la membrana externa por una maquinaria secretora especializada consistente de cuando menos 12 diferentes componentes. La mayoría de los componentes de esta vía son proteínas de la membrana interna, algunas son de la membrana externa y por lo menos un componente es citosólico o asociado periféricamente a la membrana interna<sup>(3)</sup>: Esta vía parece ser la más empleada por las bacterias gram negativas para la translocación de sus proteínas. Este sistema exporta muchos tipos diferentes de moléculas, incluyendo algunos factores de virulencia<sup>(17)</sup>. Mediante el empleo de la secuencia señal de algunas proteínas exportadas por este sistema ha sido posible la translocación de proteínas recombinantes heterólogas al periplasma bacteriano<sup>(13)</sup>, pero la translocación está restringida a este compartimento bacteriano, ya que aún se desconoce lo que determina el paso de las proteínas del periplasma a la superficie bacteriana o al medio extracelular; sin embargo se han postulado dos vías por las que las proteínas de membrana interna llegan a la membrana externa: el modelo de las uniones de Bayer postula que las proteínas de membrana externa cruzan a través de zonas de adhesión entre las dos membranas y el modelo de intermediario periplásmico sugiere que las proteínas de membrana externa transitan a través del periplasma, navegan por la estructura de red de la peptidoglicana y se insertan subsecuentemente en la membrana externa<sup>(18)</sup>. Ha habido intentos fallidos por intercambiar componentes homólogos del aparato de secreción de tipo II entre varios sistemas bacterianos y quizá esto se deba a las interacciones específicas proteína-proteína que se requieren para el ensamblaje y función de cada una de ellas<sup>(19)</sup>.

## Sistema de secreción tipo III.

El sistema de secreción tipo III comprende una ruta compleja de patogenicidad. Por esta vía se secretan proteínas de una variedad de patógenos humanos y de plantas dentro de las células huésped<sup>(4)</sup>. El ejemplo más representativo de este sistema lo conforman las proteínas *Yops* en las especies de *Yersinia*. Este sistema de secreción está constituido aproximadamente de 20 polipéptidos<sup>(14)</sup> localizados predominantemente en la membrana citoplásmica, pero con al menos un componente en la membrana externa y este proceso de translocación depende de ATP. Existe un debate entre los grupos que apoyan la idea de que la secuencia señal se localiza en la proteína ya sintetizada (en los 15-20 aa en el amino-terminal)<sup>(14, 22)</sup>, o en la región 5' del RNA<sup>(23)</sup>. En lo que acuerdan estos grupos es que cada proteína secretada parece tener su chaperona citosólica

correspondiente que reconoce una porción (usualmente la región amino-terminal) de la proteína secretada que es crítica en la mediación secretora. La conservación de este sistema es tal, que si la chaperona adecuada y la proteína secretora son colocadas en otro organismo que contiene otro sistema de tipo III, la secreción heteróloga ocurre <sup>(20, 22, 23)</sup>. Las proteínas secretadas por esta vía son también trasladadas sin un aparente intermediario periplásmico. Mediante este sistema de secreción muchas bacterias patógenas logran translocar sus proteínas efectoras hasta el citoplasma del hospedero, lo cual implica la formación de un canal en la membrana de la célula huésped <sup>(21)</sup>. Aprovechando esta facultad, se ha empleado con éxito la proteína Srp, que es un componente del sistema de secreción tipo III de *Salmonella typhimurium* para enviar péptidos heterólogos fusionados a esta proteína al citoplasma de células de mamífero infectadas con el microorganismo, generándose una respuesta citotóxica por linfocitos T CD8<sup>+</sup> específica para los péptidos heterólogos <sup>(21)</sup>.

#### **Sistema de secreción tipo IV.**

Los transportadores de tipo IV en general, contienen 2 proteínas con motivos de unión a nucleótidos. Alternativamente, estas proteínas parecen funcionar como puente o canal vía cinasa, o actúan como chaperonas moleculares en el proceso de ensamblaje del transportador o durante el proceso de transporte en sí <sup>(7)</sup>.

Se sabe que el sistema de tipo IV secreta tres tipos de sustratos: DNA intermediario de conjugación, la multisubunitaria toxina Pertusis y proteínas monoméricas incluyendo primasa, RecA, las proteínas VirE2 y VirF de *Agrobacterium tumefaciens* y la proteína CagA de *Helicobacter pylori* <sup>(24)</sup>. La mayoría de los sistemas de secreción tipo IV transfieren DNA, pero es importante resaltar que el intermediario de conjugación no es DNA desnudo, sino ssDNA asociado con una o más proteínas <sup>(24)</sup>. En el caso de *A. tumefaciens*, se sabe que cuando esta bacteria detecta compuestos fenólicos derivados de células vegetales, estos señalan la expresión de factores de virulencia localizados en el plásmido Ti (genes *vir*), desde VirB1-VirB11, teniendo cada uno de ellos diferentes funciones que finalmente conducen a la formación del puente por el que se transloca el plásmido Ti a la célula vegetal <sup>(25)</sup>. El antígeno CagA de *H. pylori* resulta de peculiar interés ya que esta es una proteína que se transloca al citoplasma de la célula hospedera y aquí se fosforila en residuos de tirosina, se forma el pedestal que conecta ambas células y se activa una transducción de señales en la célula eucariota que la conduce a la inducción de NF- $\kappa$ B con la subsecuente secreción de una de las interleucinas proinflamatorias (IL-8) <sup>(26)</sup>. Estos ensayos fallan en la translocación de la proteína y por lo tanto en la fosforilación de la misma cuando se efectúan en células mutantes en algunos de los genes *vir* <sup>(27)</sup>, lo cual implica que estos son indispensables en el proceso de translocación.

Este sistema de secreción es bastante parecido al sistema de tipo III en muchos aspectos:

- Ambos sistemas transportan sustratos en un proceso que requiere de contacto con la célula receptora.

- Requieren del acoplamiento de proteínas chaperonas
- Elaboran pilis extracelulares o filamentos que contribuyen a la translocación del sustrato.

La diferencia que existe entre ambos sistemas es que el de tipo IV puede exportar grandes polímeros de DNA a las células receptoras, mientras que el sistema de tipo III no lo hace <sup>(24)</sup>.

### **Sistema de secreción tipo V “Autotransportadores”.**

El último sistema de secreción conocido a la fecha que opera en bacterias Gram-negativas es denominado familia de los autotransportadores <sup>(5)</sup>. La proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae* es representativa de este sistema y fue la primera en ser descrita como miembro de esta familia <sup>(28)</sup>. Otros autotransportadores pueden ser encontradas en *Bordetella pertussis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* y *H. pylori* <sup>(29, 30)</sup>.

El nombre de autotransportadores se debe a que no se conoce que participen otras moléculas accesorias para la translocación de estas proteínas a la membrana externa bacteriana, es decir, estas moléculas pueden dirigir su propio paso a través de la membrana externa, aparentemente por la formación de un poro mediante su extremo carboxilo terminal a través del cual pasa <sup>(5)</sup>.

Durante la secreción de la proteasa de IgA, un precursor es procesado en ambos extremos amino y carboxilo-terminal. La exportación de este precursor al periplasma bacteriano es mediada por el sistema-*sec* (tipo-II) . El paso de la proteína a través de la membrana externa es mediado por su dominio carboxilo terminal, proceso que requiere de energía. Se sugiere que el extremo carboxilo terminal del precursor de la proteasa de IgA forma una estructura de membrana integral muy parecida a la de la porina OmpF de *E. coli*, formando láminas- $\beta$  anfipáticas antiparalelas arregladas en una conformación cilíndrica- $\beta$  hipotética. Se asume que el dominio amino-terminal es translocado a través del poro del cilindro- $\beta$  hacia la superficie celular bacteriana, donde la proteasa de IgA usa su actividad catalítica para romper y liberarse por sí misma del cilindro- $\beta$ . Analizando varios miembros de esta familia pueden identificarse tres dominios estructurales en todas las moléculas autotransportadoras, éstas son: un péptido líder amino-terminal, un dominio pasajero o también llamado dominio- $\alpha$  (proteína “madura”) y un dominio carboxilo-terminal (llamado dominio  $\beta$ ) que media la secreción a través de la membrana externa. Se considera que estos dominios confieren todas las características requeridas para mediar los diversos pasos en el transporte a través de las membranas interna y externa. Actualmente se conocen ya muchos miembros de esta familia (Tabla I) y han sido exploradas en su capacidad de translocar dominios alfa heterólogos. Como ejemplo se tiene la proteasa de IgA que ha sido empleada para secretar la subunidad B de la toxina del cólera al medio extracelular exitosamente <sup>(31)</sup>, o bien, se ha logrado con éxito la translocación de esta subunidad en la superficie bacteriana mediante el empleo de otro autotransportador, la proteína AIDA (adhesina involucrada en adherencia difusa) de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) <sup>(32)</sup>.

**Tabla I.** Funciones de los dominios pasajeros de los autotransportadores.

<b>Organismo</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Función (es)</b>
<i>Bordetella</i> spp.	Pertactina BrkA TcfA Vag8	Adhesina Resistencia a suero Adhesina Adhesina
<i>Dichelobacter nodosus</i>	BprV BprB AprV2 BprX	Elastasa? Elastasa? Elastasa? Elastasa?
<i>Escherichia coli</i>	EspP Pet Sat Tsh  Pic AIDA-I TibA Ag43	Toxina proteolítica Toxina proteolítica Toxina proteolítica Hemaglutinina/de unión a hemoglobina Mucinasa Adhesina Adhesina Formación de biopelícula / Adhesina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Proteasa de IgA1 Hap Hia Hsf	Ruptura de IgA1 Adhesina/proteasa Adhesina Adhesina
<i>Helicobacter mustelae</i>	Hsr	Capa S?
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA BabA	Toxina Adhesina
<i>Moraxella catharralis</i>	UspA1 UspA2 UspA2h	Adhesina Resistencia a suero Adhesina
<i>Neisseria</i> spp	Proteasa de IgA1	Ruptura de IgA1
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Ssa1	Proteasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EstA	Esterasa
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PspA PspB	Proteasa Proteasa
<i>Rickettsiales</i>	rOmpA rOmpB	Adhesina Capa S/Adhesina
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ApeE	Esterasa
<i>Serratia marscesens</i>	PrtS PrtT Ssp-H1 Ssp-H2	Proteasa Proteasa Proteasa Proteasa
<i>Shigella flexneri</i>	SepA  Pic SigA IcsA	Proteasa/inflamación / Invasión Mucinasa Toxina proteolítica Mediador de la motilidad intracelular
<i>Xenorhabdus luminescens</i>	PlaA	Lipasa

Tomada de Henderson, I. A. and Nataro, J. P. "Virulence functions of autotransporter proteins" *Infect. Immun.* 2001 Vol 69, (3): 1231-43 <sup>(47)</sup>.

Recientemente se ha identificado el gen que codifica la proteína MisL (proteína de membrana de inserción y secreción) en *Salmonella typhimurium*, que podría ser el primer autotransportador identificado en el género *Salmonella*. Este gen (Figura 1) se encontró dentro de una isla de patogenicidad (SPI-3) y aún se desconoce su función, pero presenta similitud con la familia de proteínas autotransportadoras. Las islas de patogenicidad son elementos de DNA cromosomal ausentes de bacterias no patógenas. Estas islas a menudo tienen una proporción de GC diferente del encontrado en el cromosoma del organismo hospedero y usualmente están flanqueadas por secuencias de inserción, genes de bacteriófagos o transposones <sup>(33)</sup>. Además de las pequeñas isletas de patogenicidad, se han identificado 5 islas de patogenicidad en *Salmonella*. La SPI-1 es de 40 Kb y capacita a la bacteria para invadir las células epiteliales y se requiere en la inducción de apoptosis de macrófagos infectados. La SPI-2 también es de 40 Kb de longitud y porta genes necesarios para la supervivencia en macrófagos e inducir la infección sistémica. La SPI-3 contiene al menos 10 genes, 2 de los cuales ya han sido descritas sus funciones, y los demás muestran similitud a factores de virulencia en otras especies bacterianas. La SPI-4 incluye un locus de sobrevivencia en macrófago y la SPI-5 contiene genes que median la enteropatogénesis <sup>(33)</sup>.

El hecho de que la proteína MisL se haya encontrado en una isla de patogenicidad sugiere que se trata de un factor de virulencia del microorganismo, pero que aún no se conoce.

La homología entre MisL y la proteína AIDA-1 de *E. coli* enteropatogénica y la proteína VirG de *S. flexneri* está limitada al extremo carboxilo terminal (Figura 2), sugiriendo una función similar en los autotransportadores, más que similitudes funcionales dadas por el dominio alfa, las cuales han sido adjudicadas a la adherencia difusa en células HeLa y a la propagación célula-célula respectivamente <sup>(33)</sup>.



2 AIDA DF LGIMGGYANAKGK INY NKAARN LDGY VGVYG WYQNGENA GEFAE WMOY

781 840

1 MisL NWFDNKVMGODQAAFKYKSKGI A VEAGY FRLGE AHQSYWLOPKAQY WMGVQADDN

2 AIDA-1 NWFNA MKGDCLEEEKYNLNL A AGGGYNL NvEGE GEFWLOPHIQAVWMCV PD H

841 900

1 MisL REANG LMKDD AGNLL RMGVKAYINGHNAIDNDK REFQFFVEANWIHN QPA MKMD

2 AIDA-1 QEDNG VVQGACKNNIQ KAGIRASWKVKSTLDKD CRRFRREYIEANWIHN HEFSYKM

901 955

1 MisL DV SDMRG KNIGEIKVGIIEGV PRENWNVAQQVGD GY D QGMLGMKY F

2 AIDA-1 DD QLL G RNOGEIK GIEGVI QNL VNGVAYQAGGHGSNAI GALGKY F

Figura 1. Alineamiento de la secuencia aminoacídica entre AIDA-1 de *E. coli* y MisL de *S. typhimurium*.

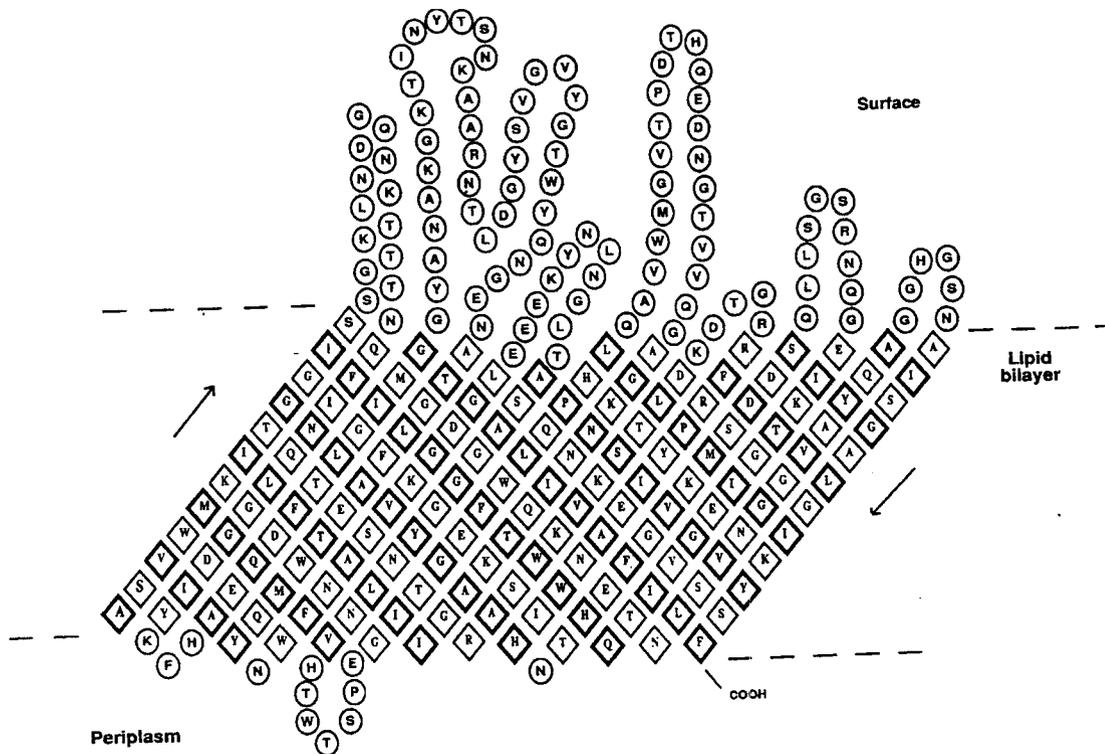


Figura 2.- Estructura hipotética del dominio beta del autotransportador AIDA-1. Esta es la que se inserta en la membrana externa y forma el poro a través del que pasa el dominio pasajero o dominio alfa. Tomada de Maurer, J, et al *J. Bact* 1997, 179 (3):794-804<sup>(32)</sup>.

Dadas las características que presenta este sistema de secreción, a la sencillez relativa para la translocación de proteínas a la membrana externa y el que no sean necesarias proteínas accesorias para tal fin, hace atractiva la explotación de esta ruta de secreción para la expresión de antígenos heterólogos en la superficie de acarreadores bacterianos, ya que existe evidencia suficiente de que la expresión de antígenos heterólogos en compartimentos como el periplasma, la membrana externa o en la superficie de la bacteria, el péptido recombinante es más inmunogénico que si se expresa citosólicamente <sup>(34, 48, 49)</sup>. Además del creciente interés por expresar polipéptidos heterólogos en la superficie de bacterias <sup>(50, 51)</sup>.

El que existan cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* (SL3261) y *typhi* con mutaciones múltiples que aseguran la no reversión de la virulencia y que han sido empleadas exitosamente por nuestro grupo de trabajo <sup>(35, 36)</sup>, hace atractivo su uso para la generación de herramientas que permitan la translocación de péptidos heterólogos en la superficie bacteriana empleando el autotransportador MisL.

## **JUSTIFICACIÓN.**

La sencillez que presenta el sistema de secreción de tipo V procariótico, así como la identificación del primer autotransportador en el género *Salmonella*, microorganismo empleado exitosamente como acarreador bacteriano, hacen atractiva la utilización del segmento responsable del autotransporte de proteínas para translocar péptidos heterólogos a la superficie bacteriana.

## **HIPÓTESIS.**

La secuencia homóloga de la proteína MisL con la proteína AIDA-1 corresponde al dominio  $\beta$  de un autotransportador y es la responsable de la función de autotransporte de proteínas a través de la membrana externa de bacterias gram negativas.

**225720**

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

Emplear el segmento del autotransportador MisL responsable de la translocación de péptidos hacia la superficie de *Salmonella enterica*.

### Objetivos específicos:

- Construir un plásmido que incluya: un promotor inducible in vivo, la secuencia señal de exportación a periplasma, el oligo bandera y el dominio  $\beta$  de MisL.
- Transformar *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con la construcción generada.
- Rastrear el compartimiento al que se dirige el péptido bandera
- Determinar la expresión del péptido bandera en la superficie de *E. coli*
- Transformar con las construcciones mediante electroporación a cepas atenuadas de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*.
- Evaluar la translocación de los epítomos en la superficie de *Salmonella*
- Evaluar la inmunogenicidad del epítomo expuesto
- Evaluar la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos generados por la construcción contra el péptido en su forma nativa.

## I. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### MATERIAL Y METODOS

#### Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261 y *Salmonella enterica* serovar *typhi* CVD908, fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB, Gibco) y BHI (Difco). Adicionalmente, a las cepas *Salmonella typhi* CVD908 (cepa mutante  $\Delta$ aroC,  $\Delta$ aroD<sup>(53)</sup>) donada por el Dr. Myron Levine, Center for Vaccine Development, Universidad de Maryland, Baltimore, USA) y *Salmonella typhimurium* SL3261 (mutante  $\Delta$ aroA)<sup>(52)</sup> se les añadió ácido dihidroxibenzoico (3 ng/ml) y en su caso, ampicilina a una concentración final de 750  $\mu$ g/ml.

#### Transformación de *Salmonella typhi* CVD908 y de *Salmonella typhimurium* SL3261.

La transformación de *Salmonella typhi* CVD908 se llevó a cabo por electroporación y la preparación de las células bacterianas electrocompetentes se hizo de acuerdo al siguiente protocolo: a partir de una fuente fresca de *Salmonella typhi* CVD908 se tomó una asada bacteriana y se inoculó 200mL de medio BHI-DHB 0.1%, se incubó a 37°C en agitación de 200 rpm hasta alcanzar una absorbancia de 1.0 a 600 nm.

Se cosechó la bacteria y se lavó tres veces con agua desionizada. Finalmente la pastilla bacteriana fue resuspendida en 500  $\mu$ L de agua desionizada.

Se tomaron de 100 a 300µL ( $\approx 4 \times 10^8$ ) de la suspensión bacteriana y se incubó con el DNA de interés durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a electroporar usando celdas de 300µL (Bio Rad) y bajo las siguientes condiciones 200mV, 0.5 A, 2000R. Después del pulso eléctrico rápidamente se incubaron con 900 µL de medio SOC-DHB 0.1 % (250 mM de KCl, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2g/L triptona, 5g/L de extracto de levadura y 20 mM de glucosa) y se incubaron a 37 °C en agitación de 200 rpm durante 45 min. Finalmente, se sembraron 100 µL de la bacteria transformada en placas de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 24 hrs.

### TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE.

La preparación del DNA, la manipulación genética, las técnicas de PCR, inmuno-electrotransferencia y transformación bacteriana, se realizaron de acuerdo a las especificaciones y protocolos de Sambrook y Maniatis<sup>(37)</sup>.

#### **Amplificación del dominio β del gen *misL* de *Salmonella typhimurium*.**

La amplificación se realizó en un volumen de 30 µl con 100-200 ng de DNA obtenido por ebullición de  $1 \times 10^9$  bacterias de *Salmonella typhimurium* SL3261, 3 µl de amortiguador 10X, los 4 dNTPs 200 µM cada uno, 1 pM de cada oligonucleótido, 0.5 U de Vent polimerasa y 1.5 mM de MgSO<sub>4</sub>. Las condiciones de amplificación fueron:

Evento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Preamplificación	94	3'	1
Desnaturalización	95	15''	30
Alineamiento	66	45''	
Extensión	72	2'	
Extensión larga	72	5'	2
Enfriamiento	4	Ilimitado	

#### **Oligonucleótidos para la amplificación de β de *misL*.**

*Nhe* I

MisL-1 5' GGC TAA GCT AGC CAT GAA GAT GGC GAA CCA TGG 3'

*Xba* I

MisL-2 5' GCT AAG TCT AGA TCA GAA ACT GTA TTT CAT CCC CAG 3'

#### **Digestión y desfosforilación del plásmido pnirLTBsp (2425 pb)**

Se mezclaron 10-20 µg de DNA plasmídico con 3 U de *Nhe* I por 2 horas a 37 °C, se separó por electroforesis en gel de agarosa 1% y se separó la banda correspondiente al plásmido linearizado. Se purificó este fragmento del gel por "GeneClean<sup>®</sup>" y se desfosforiló en un volumen total de 50 µl que incluyeron 5 U de



### **Obtención de proteínas de membrana externa (OMP).**

Se cultivaron las bacterias en medio tioglicolato-ampicilina y DHB (en su caso) por 18 horas a 37 °C y se cosecharon por centrifugación a 4000 xg por 15 minutos a 4 °C, se resuspendieron en amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)-EDTA 10 mM y se fraccionaron en prensa French a 20000 psi o por sonicación. Las células no fraccionadas se removieron por centrifugación. El sobrenadante fue incubado con tritón X-100 al 1% durante 30 minutos y se centrifugó a 100000 xg durante 60 minutos a 4 °C en una Beckman Optima™ XL-100K Ultracentrifuge. Las pastillas que contienen OMPs fueron resuspendidas en amortiguador Tris-EDTA 10mM y mantenidas a 4 °C.

La proteína fue cuantificada de acuerdo a la técnica de Bradford tomando como referencia a la proteína albúmina sérica bovina.

### **Obtención de las proteínas totales.**

Se cultivaron las cepas bacterianas en medio tioglicolato-DHB-ampicilina bajo anaerobiosis y se dejaron crecer hasta alcanzar una D.O. de 0.6-1.0 a 540 nm, se centrifugaron a 6000 rpm/5', se lavaron 2X con SSI y se mezclaron con amortiguador muestra para SDS-PAGE.

### **Obtención de las proteínas periplásmicas.**

Se cultivaron las bacterias en condiciones inductoras y se cosecharon por centrifugación a 4000 xg durante 5 minutos, se resuspendió el botón en Tris-HCl, 20% de sacarosa a pH 8.0 y se añadió 1mM de EDTA, se incubó a T ambiente durante 5-10 minutos con agitación y se centrifugaron a 8000 xg a 4 °C por 10 minutos y el botón se resuspendió en 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 5mM, frío. Se agitaron por 5-10 minutos en baño de hielo y se centrifugaron a 8000 xg a 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante es el producto del choque osmótico y corresponde a la fracción periplásmica.

### ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

30 µg/mL de proteínas de membrana externa purificadas o de proteínas totales de cada cepa de interés, fueron separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras en una unidad electroforética vertical (Gibco, Life Sciences Instruments) de acuerdo al método de Laemmli<sup>(40)</sup>.

Las muestras proteicas fueron resuspendidas en amortiguador de muestra (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.1%), se desnaturalizaron por ebullición durante 5 min. La composición del gel concentrador (parte superior del gel) fue de 2.5% de acrilamida, 0.13% de Bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8. La composición del gel de resolución (parte inferior del gel) fue de 12% de acrilamida, 2.5% de Bis-acrilamida, 0.66% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8. El amortiguador de corrimiento consta de Tris 0.025 M, glicina 0.195 M y SDS al 0.1%, con un pH de 8.3. La separación de las proteínas se llevó a cabo durante 1 hora a 30 mA.

### INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

30 µg/mL de proteínas de membrana externa purificadas o 50 µg/mL de proteínas totales de cada una de las cepas de interés fueron separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras en una unidad electroforética vertical (Gibco Life Sciences instruments) de acuerdo al método de Laemmli. Se transfirieron a papel de nitrocelulosa (0.45 Micron Hybon-C, Amersham) en una unidad de transferencia electrónica (BioRad 2005 Transphor) durante 3 hrs a 0.5 A. Posterior a la transferencia el papel fue bloqueado con PBS-leche al 5% durante 1 hr, se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo monoclonal 2A10 en una dilución 1:500 en PBS-leche al 5% durante toda la noche a 45 rpm a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS y tres veces con PBS-Tween al 0.1%. Se adicionó el segundo anticuerpo (Ig de cabra contra IgG de conejo o contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa, Sigma) en una dilución 1:1000 en PBS-leche al 5% y se incubará a 45 rpm a T ambiente durante 45 min. La reacción inmunológica fue revelada por la actividad de peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo con  $\alpha$ -4-Cloro Naftol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Se cultivaron las bacterias bajo condiciones inductoras (anaerobiosis) durante 18 horas o hasta alcanzar una D.O. 1.0 a 540 nm, se tomó una alícuota correspondiente a  $1 \times 10^8$  bacterias y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se lavó 2X con SSI estéril o PBS filtrado por 0.22 µm. Se resuspendieron las pastillas en 60 µl del anticuerpo 2A10 en una dilución 1:500 y se incubaron durante 1 hora a T ambiente, en agitación, transcurrido este tiempo se centrifugaron a 6000 rpm y la pastilla se lavó 2X con PBS filtrado. Se incubó con 60 µl del anticuerpo cabra anti-ratón-FITC en una dilución 1:100 durante 1 hora, en agitación y en oscuridad. Se centrifugaron a 6000 rpm y la pastilla se lavó 2X con PBS filtrado. Se resuspendió el botón en 500 µl de PBS y se realizaron frotis en portaobjetos que fueron analizados con un microscopio de fluorescencia (Olympus).

### CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se cultivaron las bacterias bajo condiciones inductoras (anaerobiosis) durante 18 horas o hasta alcanzar una D.O. 1.0 a 600 nm, se tomó una alícuota ajustada a  $1 \times 10^8$  bacterias y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se lavó 2X con SSI estéril o PBS filtrado por 0.22 µm. Se resuspendieron las pastillas en 60 µl del anticuerpo 2A10 en una dilución 1:500 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación, transcurrido este tiempo se centrifugaron a 6000 rpm y la pastilla se lavó 2X con PBS filtrado. Se incubó con 60 µl del anticuerpo cabra anti-ratón-FITC en una dilución 1:100 durante 1 hora, en agitación y en oscuridad. Se centrifugaron a 6000 rpm y la pastilla se lavó 2X con PBS filtrado. Se añadieron 500 µl de PBS filtrado y 10 µl de yoduro de propidio (1 mg/ml)<sup>(38,39)</sup>. Se analizaron en un equipo de Citometría de flujo de Becton-Dickinson.

## INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/C CON CEPAS ATENUADAS DE *Salmonella typhi* CVD908

Ratones hembra cepa BALB/c de 4 semanas de nacidos, con un peso de 30-40 g fueron inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 que llevaban diferentes plásmidos (controles y experimental) por vía intranasal con  $10^{10}$  bacterias no inducidas diluías en solución salina isotónica estéril.

## DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA EL PÉPTIDO NANP POR ELISA

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Corning) con 5  $\mu$ g de péptido NANP sintético disuelto en amortiguador de carbonatos en un volumen de 100  $\mu$ l y se incubaron por 2 horas a 37°C y posteriormente durante toda la noche a 4°C. Se lavaron con PBS-Tween 0.1% 1 vez y una segunda vez sólo con PBS. Se incubó el suero de los ratones a diferentes diluciones en PBS-leche 5% durante 2 horas a 37°C y se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween 0.1% y 1 vez con PBS. Se dispensaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa en una dilución 1:2000 diluído en PBS-leche 5% y se incubaron las placas a 37°C durante 2 horas, tiempo después del cual fueron lavadas con PBS-Tween 0.1% 3 veces y 2 veces con PBS. Se dispensaron 100  $\mu$ l/pozo de la solución reveladora y las placas fueron mantenidas en oscuridad por un periodo de 10-20 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N y las placas fueron leídas en un espectrofotómetro para placas de ELISA (ELX808) a una D.O. de 490 nm

## EVALUACION DEL RECONOCIMIENTO POR EL ANTIGENO NATIVO DE LOS SUEROS OBTENIDOS POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se procedió a hacer un ensayo de reconocimiento de los anticuerpos generados en ratón con las cepas de *Salmonella typhi* CVD908 pnrLTBsp(NANP)<sub>4</sub> $\beta$ MisL (NANPMisL) por la forma nativa de la proteína CSP de *P. falciparum*. Para esto, laminillas con esporozoitos fijados fueron incubadas con el suero de ratones inmunizados; como control negativo, se empleó el suero de ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 pnrLTB $\beta$ MisL “MisL” (sin el péptido inmunogénico NANP). Después de 30 minutos de incubación en cámara húmeda, las laminillas se lavaron con PBS-Tween 0.1% 2 veces y 2 veces más con PBS. Después, estas laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón 1:500) conjugado a FITC, se incubó durante 30 minutos y se lavó como se describió anteriormente. Se analizó la laminilla bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus).

# RESULTADOS

## I.- Construcción de los plásmidos.

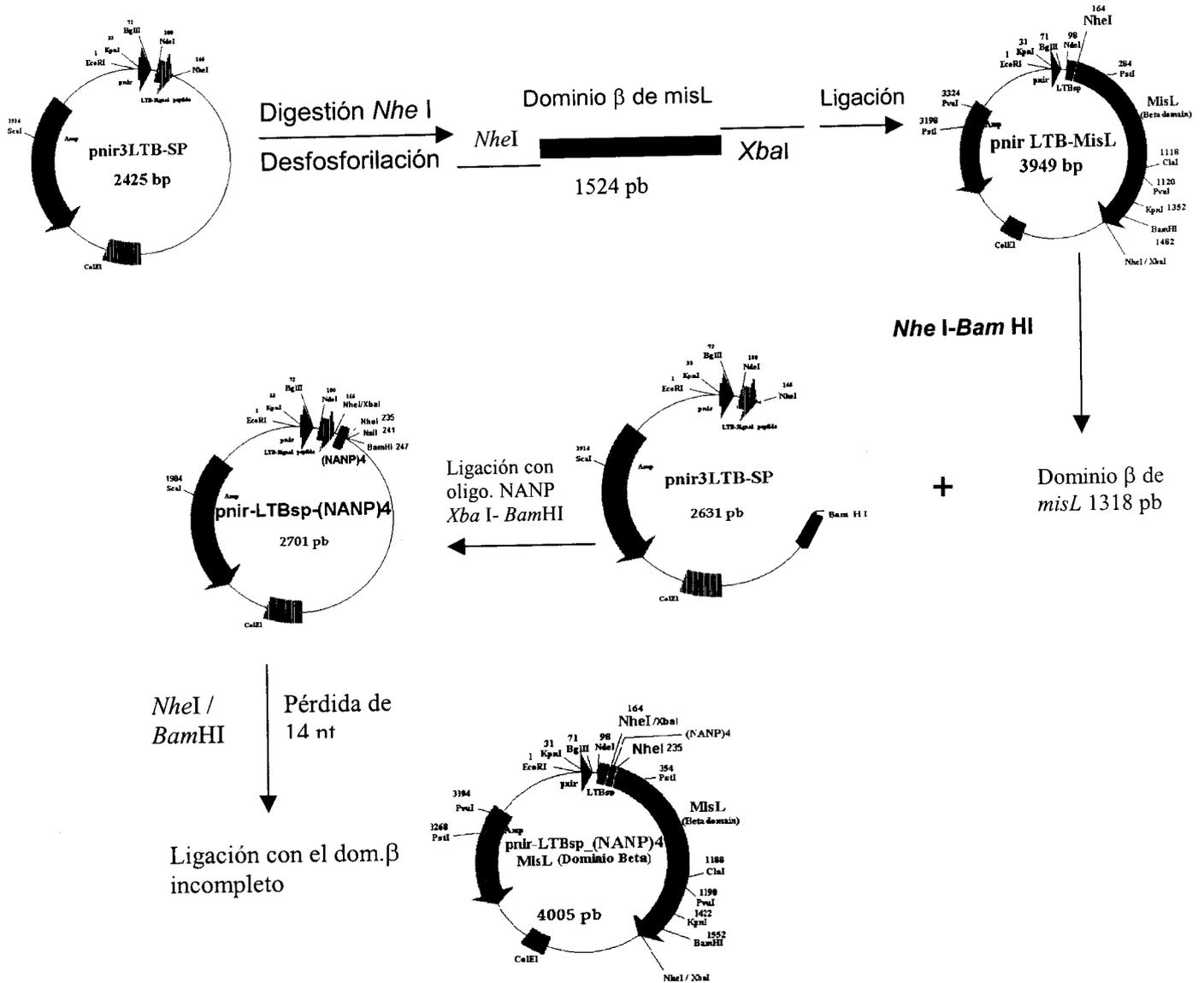


Figura 3.- Diagrama esquemático de la construcción de los plásmidos.

## 1.- Obtención del dominio $\beta$ de MisL por PCR

Dentro de la estructura de los autotransportadores, el segmento que corresponde al dominio  $\beta$  es el que forma  $\beta$ -plegadas que se insertan en la membrana externa formando un poro a través del cual se transloca el dominio  $\alpha$ .

En este trabajo se amplificó la sección que correspondería al dominio  $\beta$  de *misL* (segmento postulado a partir de la comparación con AIDA-1 de *E. coli*, ver alineamiento) y se amplificó el segmento desde el nucleótido 1342 hasta el 2869 (Fig. 4), con el objeto de obtener el dominio  $\beta$  además de la región “linker” que pasa por el poro membranal (Fig 2). Los oligonucleótidos MisL-1 y MisL-2 empleados para esta reacción de amplificación contenían en los extremos sitios *Nhe* I- *Xba* I para obtener un producto de PCR con dichos sitios de restricción y así facilitar la reacción de ligación con el plásmido pnrLTB digerido con *Nhe* I (recordar que *Nhe* I es isocaudámero de *Xba* I). Una vez obtenido este producto de ligación “pnrLTB $\beta$ MisL”, se digirió el plásmido con las enzimas *Nhe* I-*Bam* HI (sitio de corte interno del gen *misL*) lo cual desinserta el dominio  $\beta$  de *misL* incompleto (1318 pb), se separaron ambos fragmentos por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y se purificaron por “GeneClean® ” (Figura 5). Con el fragmento de 2631 pb se procedió a ligar con el oligonucleótido sintético (NANP)<sub>4</sub> el cual posee sitios internos para *Nhe* I, *Nsi* I y sitios laterales para *Xba* I y *Bam* HI. Estos sitios laterales de *Xba* I y *Bam* HI promueven la clonación dirigida del oligonucleótido sintético NANP al plásmido pnrLTB $\beta$ MisL digerido con *Nhe* I-*Bam* HI (fragmento de 2631 pb en la Fig. 5). La correcta dirección que adquiera el oligonucleótido sintético garantiza el marco de lectura abierto adecuado para la obtención del péptido (NANP)<sub>4</sub>

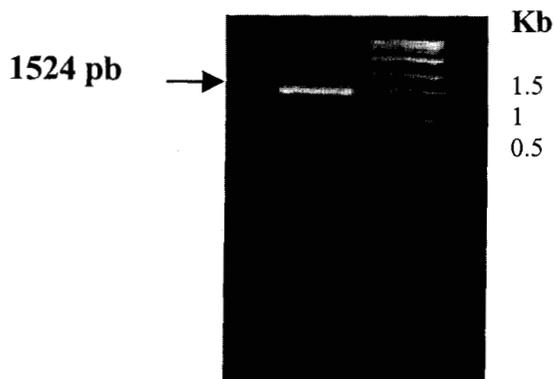


Figura 4.- Amplificación por PCR del dominio  $\beta$  de *misL*. Se extrajo por ebullición DNA de *Salmonella typhimurium* SL3261 y de este se amplificó con los oligonucleótidos MisL-1 y MisL-2 un fragmento de 1600 pb, correspondiente al dominio  $\beta$  del gen *misL*.

2.- Clonación del dominio  $\beta$  de *misL* en el plásmido pnrLTB-*Nhe* I desfosforilado.

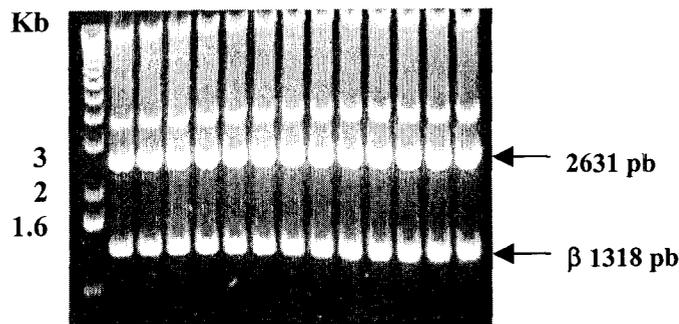


Figura 5.- Gel preparativo para la subsecuente ligación con el oligonucleótido sintético (NANP)<sub>4</sub>

Carril 1) Marcador de pesos moleculares 1 Kb

Carriles 2-14) pnrLTBdominio $\beta$ misL digerido con *Nhe* I-*Bam* HI

Al obtener el plásmido pnrLTB(NANP)<sub>4</sub> resultó difícil comprobar la ligación del oligonucleótido (NANP)<sub>4</sub> ya que eran solo 72 nucleótidos que no lo distinguirían de su control negativo pnrLTB, así que procedimos a rastrear las clonas que hubieran ligado el oligonucleótido sintético por digestión de los sitios de restricción internos *Nhe* I y *Nsi* I (Fig. 6) estos sitios son únicos y se encuentran en los oligonucleótidos sintéticos y no en el plásmido. Es importante mencionar que en este punto, en el plásmido ya no existía el sitio *Nhe* I, ya que al haber ligado el oligonucleótido sintético que tenía extremo *Xba* I, como es isocaudámero de *Nhe* I, entra a este sitio pero se pierde la secuencia de corte.

3.- Rastreo de clonas acarreadores del plásmido pnrLTB-*Nhe*I (desfosforilado) ligado al oligonucleótido (NANP)<sub>4</sub> (que lleva un sitio *Nsi* I interno, además de las colas *Nhe* I, *Bam* HI).

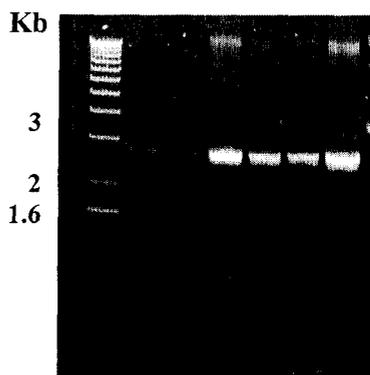


Figura 6.- Monitoreo de la inserción del oligonucleótido sintético (NANP)<sub>4</sub> en el plásmido pnrLTB.

Carril 1) Clona 1 cortada con *Nsi* I

Carril 2) Clona 1 cortada con *Nhe* I

Carril 3) Clona 1 cortada con *Bam* HI

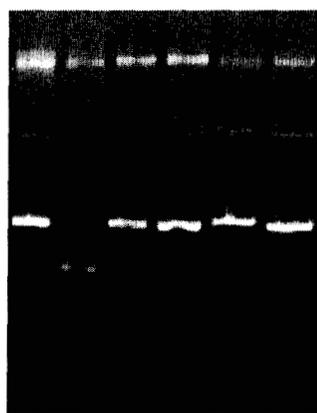
Carril 4) Clona 2 cortada con *Nsi* I

Carril 5) Clona 2 cortada con *Nhe* I

Carril 6) Clona 2 cortada con *Bam* HI

Una vez que se monitorearon las clonas que sí poseían al oligonucleótido NANP, se digirió el plásmido con *Nhe* I- *Bam* HI (lo cual hace perder el sitio *Nsi* I en el oligonucleótido (NANP)<sub>4</sub> para reinsertar el dominio  $\beta$  producto de la digestión de pnrLTB $\beta$ MisL *Nhe* I-*Bam* HI y que fue purificado por “GeneClean®” (fragmento de 1318 pb en la Fig. 5). Las clonas que reinsertaron este fragmento fueron rastreadas por incremento del tamaño del plásmido. En la Figura 7 se muestran plásmidos no digeridos de diferentes clonas y es evidente el incremento del tamaño molecular de los plásmidos en los carriles 1,3-6 comparados con la clona del carril 2.

4.- Rastreo de las clonas que reinsertaron el dominio  $\beta$  de *misL* después de una doble digestión con *Nhe* I-*Bam* HI y de la ligación con el fragmento de DNA desinsertado para ligar el oligonucleótido sintético. Plásmidos sin digerir.



225720

Figura 7.- Búsqueda de las clonas que reincorporaron el dominio  $\beta$  de *misL*, como se evidencia por incremento del tamaño molecular respecto a la clona que solo posee el oligonucleótido (NANP)<sub>4</sub> sintético.

Carriles 1, 3-6) Clonas 1-5 pnrLTB(NANP)<sub>4</sub> $\beta$  de *misL*

Carril 2) Clona 25 pnrLTB(NANP)<sub>4</sub> como control negativo.

Finalmente, en la Figura 8 se muestra la caracterización de la construcción por digestión con *Eco* RI, sitio presente en el promotor del plásmido del cual vale la pena mencionar que se caracteriza por ser un promotor fuerte inducible en condiciones de anaerobiosis y que por ello es un buen candidato a usar en construcciones de expresión *in vivo* <sup>(41, 42)</sup> y se digirió también con la enzima *Bam* HI, sitio presente dentro de la secuencia del dominio  $\beta$  de MisL, generando un fragmento de 1552 pb y otro de 2453 pb.

5.- Caracterización del plásmido por patrón de digestión con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI

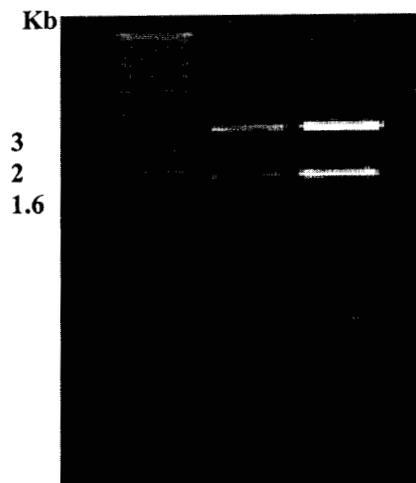
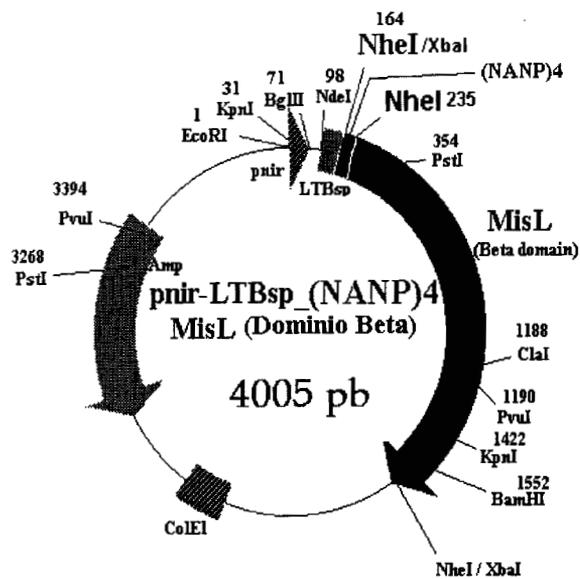
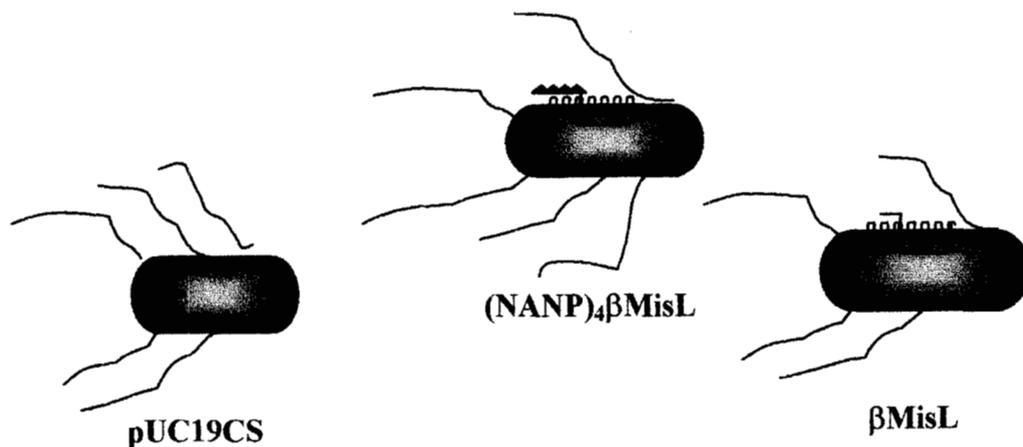


Figura 8.- Caracterización por restricción del plásmido. En los sitios *Eco* RI (localizado en el promotor *pnir*) y *Bam* HI (sitio interno del gen *misL* Carril 1) Marcador de peso molecular 1 Kb Carriles 2,3) *pnir*LTBsp(NANP)<sub>4</sub>dominioβ

## II.- Evaluación de la expresión del péptido (NANP)<sub>4</sub> por diferentes ensayos.

Antes de iniciar los comentarios para la sección de resultados, resulta adecuado explicar los controles empleados en los diferentes ensayos: MisL (sin péptido bandera, pero sí con el dominio translocador), pUC19CSP este plásmido codifica para la proteína circunsporozoítica completa, con sus 43 repetidos del epítipo NANP pero sin ser translocada a la superficie celular ni al espacio periplásmico, es decir, se queda en el citosol bacteriano. Enseguida se presentan unos esquemas de los controles empleados:



**Figura 9.- Ilustración de controles bacterianos empleados.** En donde los triángulos negros representan el epítipo NANP, como se observa la clona con pUC19CSP posee muchos de estos epítopos en el interior de la célula, mientras que la clona que acarrea estos epítopos por el autotransportador sólo tiene 4 de ellos y expuestos al medio. La clona que no posee epítipo bandera pero sí el dominio  $\beta$  del autotransportador carece de los triángulos negros.

### **Expresión del péptido en diferentes compartimentos subcelulares en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .**

Uno de los primeros ensayos para rastrear la expresión del péptido recombinante en las células bacterianas es la separación electroforética del extracto de proteínas totales y para tal efecto se obtuvieron las proteínas por ebullición de las células completas, después de haber sido inducidas por anaerobiosis. En la Figura 10, en el gel de poliacrilamida no puede distinguirse claramente del control negativo la banda de  $\approx 70$  Kda que correspondería al dominio  $\beta$  de MisL, pero en el "inmunoblot" es evidente la presencia del péptido NANP en esta fracción proteica. Este resultado nos habla de la incorporación del oligonucleótido NANP en el vector plasmídico, sin embargo, aún no se establece la función autotransportadora del dominio  $\beta$  de MisL.

Un segundo compartimento en donde era necesario evaluar la presencia del péptido, correspondía a la fracción periplásmica, ya que esto evalúa la funcionalidad de la secuencia señal amino-terminal de la toxina termolábil de *E. coli*, que dirigiría a la proteína recombinante hacia el espacio periplásmico con la escisión de la secuencia señal ( $\approx 20$  aa) llevada a cabo por una peptidasa señal localizada en la membrana interna, para tal efecto, se obtuvo la fracción proteica periplásmica por choque osmótico y se separaron por SDS-PAGE. Como se puede apreciar en la Figura 11, ahora sí se evidencia en el gel de poliacrilamida la banda correspondiente al dominio  $\beta$ , ausente en la clona transformada con pUC19CSP (carril 4) y este evento coincide con el resultado del “inmunoblot”, en donde claramente se aprecian las bandas correspondientes a (NANP)<sub>4</sub>MisL

Como el plásmido pUC19CSP no posee secuencia señal para translocación de membrana interna, se esperaba no encontrar señal del péptido NANP en el espacio periplásmico, en contraste con los extractos totales de proteínas, en donde se puede apreciar la fuerte señal de la CSP. Estos resultados nos hablan de la presencia de NANP mediada por la secuencia señal de la LTB, aún sin la intervención de  $\beta$  MisL como translocador.

Para tal efecto se realizó la extracción de proteínas de membrana externa y este resultado fue clave en la confirmación de MisL como un autotransportador, ya que la presencia de NANP en esta fracción celular obedecería únicamente a la función translocadora de  $\beta$  MisL.

Nuevamente, en la figura 12, en la parte del gel de poliacrilamida se puede observar en los carriles 2 y 3 la banda de  $\approx 70$  Kda correspondiente a  $\beta$ MisL, a diferencia de los carriles 1 y 4 en los que se dispensaron proteínas de membrana externa (PME) y totales de *E. coli* DH5 $\alpha$  pUC19CSP, respectivamente. Las proteínas totales de pUC19CSP fueron meramente el control positivo del sistema y las PME de MisL y de pUC19CSP como control negativo del método de extracción de PME.

## 1.- Evaluación de la expresión del epítipo NANP en extractos de proteínas totales.

SDS-PAGE 12.5% de proteínas totales  
con  $3 \times 10^6$  bacterias/carril

Ensayo tipo "Western blot" con el  
AcMo 2A10 anti-NANP 1:500

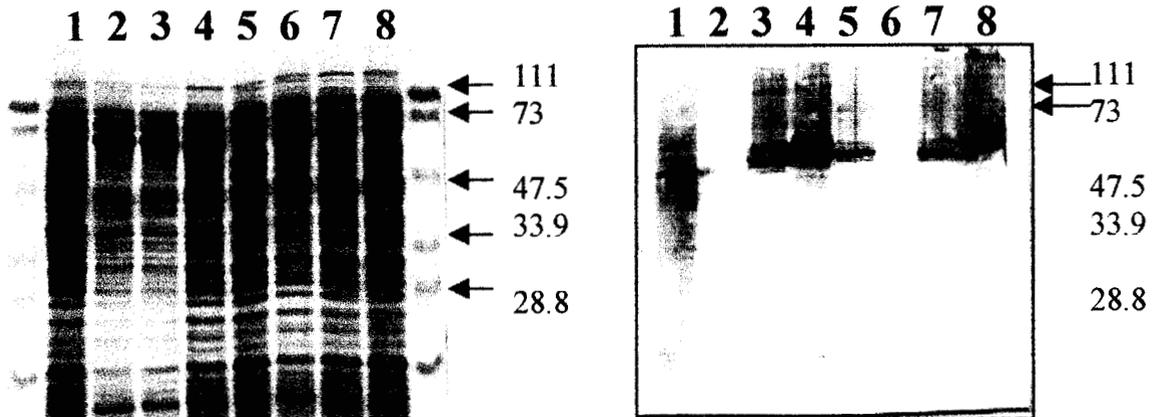


Figura 10.- Expresión del péptido NANP en extractos totales de proteínas. Extractos totales de proteínas, obtenidos por ebullición del botón bacteriano de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Como se puede ver en el gel, el dominio  $\beta$  de MisL es de aproximadamente 70 KDa, correspondiente a la banda observada en el ensayo de Inmunoblot.

- 1) DH5 $\alpha$  pUC19CSP (control positivo)\*
- 2) DH5 $\alpha$  pnrLTBsp (control negativo)
- 3) DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub>  $\beta$ MisL clona 5
- 4) DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub>  $\beta$ MisL clona 4
- 5) DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub>  $\beta$ MisL clona 3
- 6) DH5 $\alpha$   $\beta$ MisL (control negativo)
- 7) DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub> $\beta$ MisL clona 2
- 8) DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub> $\beta$ MisL clona 1

\* La clona que porta pUC19CSP contiene la proteína circunsporozoítica (43 repetidos del péptido NANP) de *Plasmodium falciparum* en el citosol

## 2.- Evaluación de la translocación del epítipo NANP al espacio periplásmico.

SDS-PAGE 12.5% de proteínas periplásmicas  
con  $1.5 \times 10^7$  bacterias/carril.

“Western blot” de proteínas periplásmicas  
con el AcMo 2A10 1:500

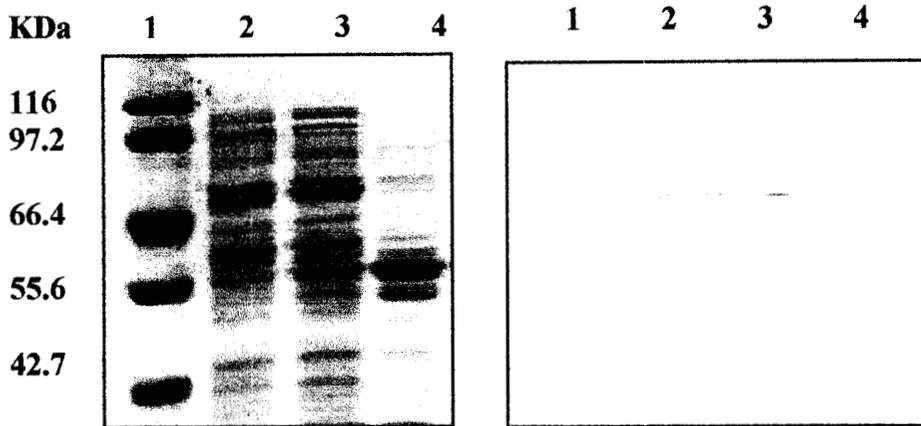


Figura 11.- Expresión del péptido NANP en la fracción periplásmica de proteínas. Esta fracción fue obtenida por choque osmótico. Como se puede observar en el ensayo de Inmunoblot, la proteína en *E. coli* DH5 $\alpha$  pUC19CSP ya no tiene acceso al espacio periplásmico, mientras que los péptidos acarreados por la secuencia señal de la LTB sí.  
Carril 1) Marcadores de p.m.  
Carriles 2-3) DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub> $\beta$ MisL clonas 1 y 2  
Carril 4) DH5 $\alpha$  pUC19CSP\*

\* La clona que porta pUC19CSP contiene la proteína circunsporozoítica (43 repetidos del péptido NANP) de *Plasmodium falciparum* en el citosol.

3) Evaluación de la translocación del péptido NANP hacia la membrana externa, mediada por el dominio  $\beta$  del autotransportador MisL.

SDS-PAGE 12.5% e "Inmunoblot" para proteínas de membrana externa (PME) extraídas por una modificación a la técnica de Schnaitman.

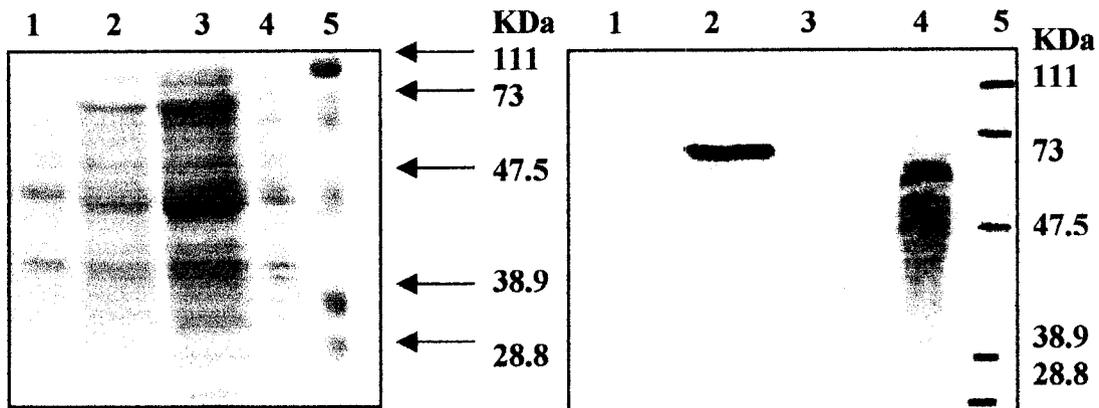


Figura 12.- Expresión del péptido NANP en extractos de proteínas de membrana externa (PME) de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Carril 1) 30  $\mu$ g de PME pUC19CSP\*

Carril 2) 30  $\mu$ g de PME (NANP) $_4\beta$ MisL

Carril 3) 30  $\mu$ g de PME  $\beta$ MisL (control negativo)

Carril 4) Extracto de proteínas totales de *E. coli* DH5 $\alpha$  pUC19CSP  $3 \times 10^6$  bact/carril (control positivo)\*

Carril 5) Marcador de pesos moleculares

\* La clona que porta pUC19CSP contiene la proteína circunsporozoítica (43 repetidos del péptido NANP) de *Plasmodium falciparum* en el citosol.

### III.- Expresión del epítipo NANP en la superficie de bacterias Gram negativas por Inmunofluorescencia y Citometría de flujo.

Habiendo comprobado la capacidad de autotransporte de MisL se procedió a transformar por electroporación a cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* y de *Salmonella typhi* (deleciones descritas en metodología “cepas bacterianas”). En estas cepas y en *E. coli* DH5 $\alpha$  se analizó la presencia de NANP en la superficie mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta en células intactas (no permeabilizadas), generando resultados alentadores, ya que un alto porcentaje de células por campo eran positivas al epítipo en la superficie (Fig. 9, 10 y 11).

#### 3.1- Evaluación de la expresión del péptido NANP en la superficie de bacterias Gram-negativas por inmunofluorescencia.

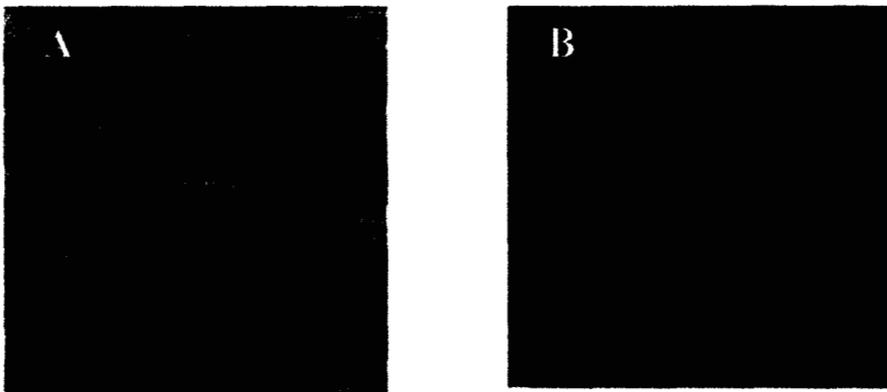


Figura 13.- Expresión del péptido NANP en la membrana de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Las bacterias intactas fueron marcadas con el AcMo 2A10, lavadas y posteriormente marcadas con anti-IgG de ratón conjugado a FITC. Se preparó un frotis y se observaron bajo luz ultravioleta en microscopio de fluorescencia. Panel A) *E. coli* DH5 $\alpha$  (NANP)<sub>4</sub> $\beta$ MisL. Panel B) *E. coli* DH5 $\alpha$   $\beta$ MisL. Aumento: 1000X



Figura 14.- Expresión del péptido NANP en la membrana de *Salmonella typhimurium* SL3261 ( $\Delta$ aroA). Las bacterias intactas fueron marcadas con el AcMo 2A10, lavadas y posteriormente marcadas con anti-IgG de ratón conjugado a FITC. Se preparó un frotis y se observaron bajo luz ultravioleta en microscopio de fluorescencia. Panel A) *S. typhimurium* SL3261 (NANP)<sub>4</sub> $\beta$ MisL. Panel B) *S. typhimurium* SL3261  $\beta$ MisL. Aumento: 1000X

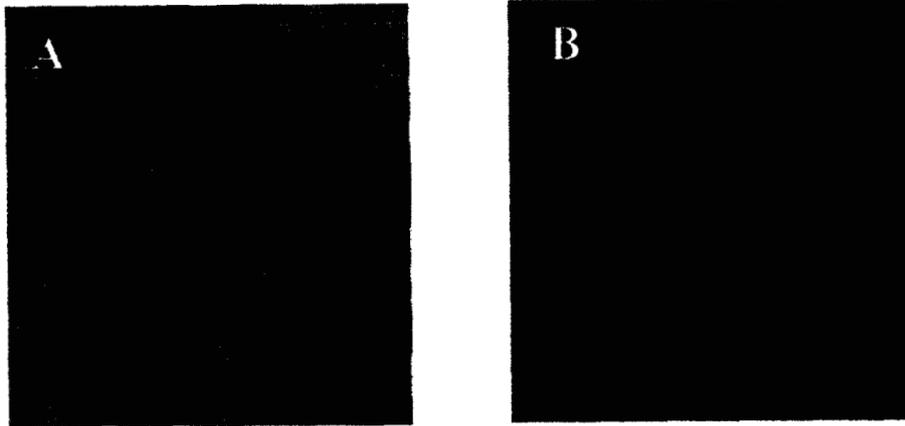


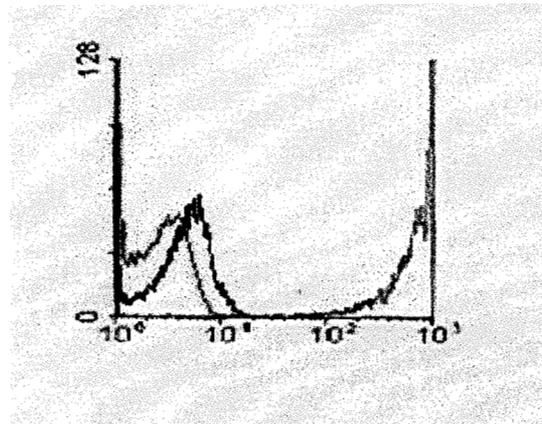
Figura 15.- Expresión del péptido NANP en la membrana de *Salmonella typhi* CVD908 ( $\Delta$ aroC $\Delta$ aroD). Las bacterias intactas fueron marcadas con el AcMo 2A10, lavadas y posteriormente marcadas con anti-IgG de ratón conjugado a FITC. Se preparó un frotis y se observaron bajo luz ultravioleta en microscopio de fluorescencia. Panel A) *S. typhi* (NANP)<sub>4</sub>βMisL. Panel B) *S. typhi* βMisL. Aumento: 1000X

Una manera más precisa de evaluar (desde el punto de vista cuantitativo) la presencia del epítipo en las tres cepas bacterianas fue por citometría de flujo. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos para *E. coli* DH5 $\alpha$  y se puede apreciar claramente cómo la intensidad de la fluorescencia del histograma correspondiente a las bacterias transformadas con (NANP)<sub>4</sub>βMisL alcanza hasta 2 logaritmos más comparada con la que alcanzaron los controles negativos.

En la Fig. 17 se tienen resultados similares para *Salmonella typhimurium* SL3261 en donde la población positiva está perfectamente bien separada de las poblaciones negativas para el epítipo y el máximo de intensidad de fluorescencia alcanza un logaritmo y medio más que las bacterias control.

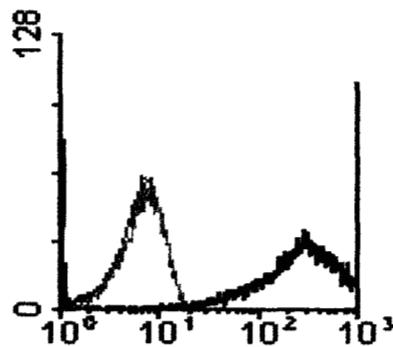
Por otro lado, en lo que respecta a *Salmonella typhi* CVD908, en la figura 18 se observa que en esta cepa expresa existen 2 subpoblaciones, una que sí expresa el péptido NANP y la otra es negativa, lo cual correlaciona con los resultados de microscopía de fluorescencia (menor número de bacterias positivas por campo), aunque la subpoblación positiva tenga una fuerte intensidad de fluorescencia (desplazamiento de 2 logaritmos más con respecto a los controles). Más adelante se discutirá este fenómeno.

**5.- Evaluación de la expresión del péptido NANP en la superficie de bacterias Gram-negativas por citometría de flujo.**



- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pnr LTBsp dominio
- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pUC19CSP\*
- *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pnr LTBsp (NANP)<sub>4</sub> dominio

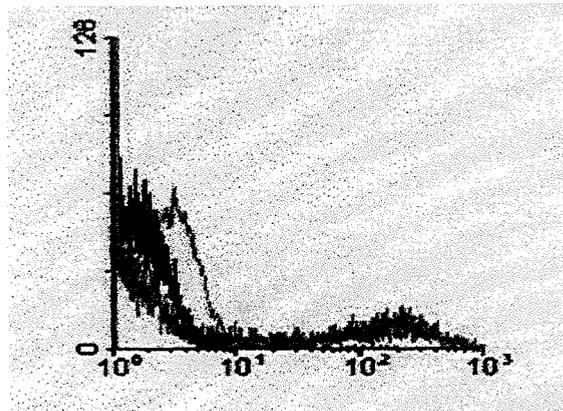
**Figura 16.-** Expresión del péptido NANP en la superficie de *E. coli*



- *Salmonella typhimurium* SL3261 pUC19CSP\*
- *Salmonella typhimurium* SL3261 pnrLTBsp  $\beta$ MisL
- *Salmonella typhimurium* SL3261 pnrLTBsp(NANP)<sub>4</sub>  $\beta$ MisL

**Figura 17.-** Expresión del péptido NANP en la superficie de *Salmonella typhimurium*.

225720



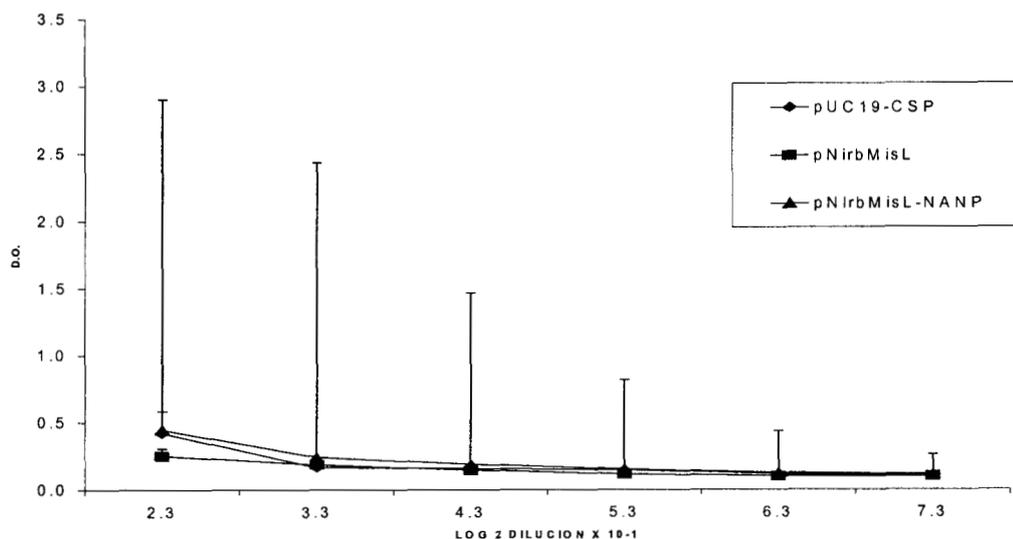
- *S. typhi* CVD908 pnrLTBsp  $\beta$ MisL
- *S. typhi* CVD908 pUC19CSP\*
- *S. typhi* CVD908 pnrLTBsp(NANP)<sub>4</sub>  $\beta$ MisL

**Figura 18.-** Expresión del péptido NANP en la superficie de *Salmonella typhi*.

\* La clona que porta pUC19CSP contiene la proteína circunsporozoítica (43 repetidos del péptido NANP) de *Plasmodium falciparum* en el citosol.

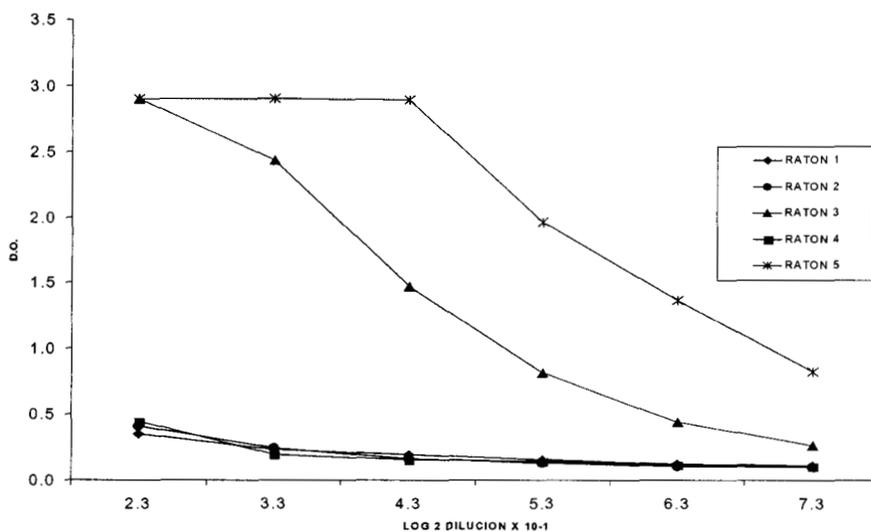
#### IV.- Inmunogenicidad del péptido NANP presente en la membrana externa de *Salmonella typhi* CVD908.

Evaluación de la respuesta inmune en los 5 ratones de cada grupo



Gráfica 1.- Evaluación de la respuesta inmune en ratones inmunizados con diferentes construcciones. La especificidad de los sueros fue evaluada por ELISA en placas sensibilizadas con el péptido NANP sintético. Se muestra el promedio de los cinco ratones/grupo.

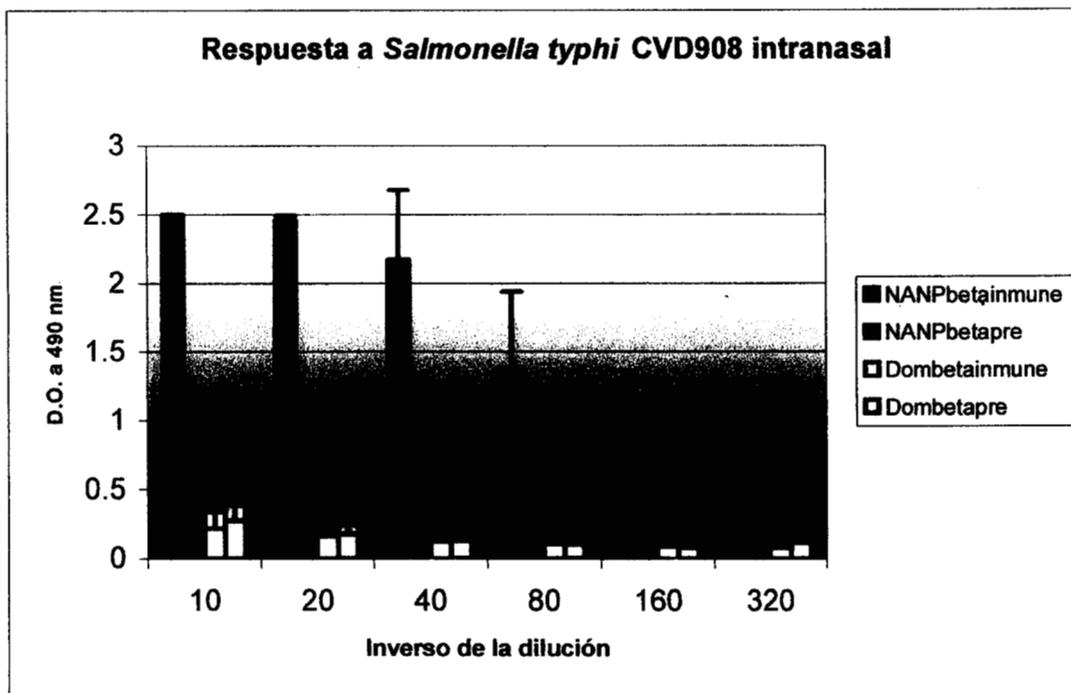
Respuesta individual de BALB/c inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 NANPMisL



Gráfica 2.- Respuesta evaluada por ratón en el grupo respondedor. La diferencia significativa entre los ratones 3 y 5 con el resto del grupo fue de 0.004 y 0.002 respectivamente, determinado por U de Mann-Whitney.

En la gráfica 1 se compara la generación de anticuerpos anti-NANP originados en el grupo de ratones BALB/c inmunizados con la bacteria atenuada viva que porta diferentes plásmidos, para la expresión de la CSP (proteína circunsporozoítica de *Plasmodium falciparum*) en el citosol o el repetido de (NANP)<sub>4</sub> en la superficie bacteriana, o el dominio translocador de MisL como control negativo; como ya se ha descrito previamente, la localización subcelular del antígeno es clave en la generación de respuesta inmune humoral, esta aseveración se confirma en la observación de la negatividad observada en los sueros de ratones inmunizados con *S. typhi* CVD908 pUC19CSP y concuerda con lo reportado previamente por González, C. y cols<sup>(36)</sup>. En lo que respecta a la respuesta a *Salmonella typhi* CVD908 NANPMisL, en la gráfica 2 puede observarse que sólo dos de cinco ratones respondieron al péptido expuesto. Este resultado concuerda con la observación de la existencia de dos subpoblaciones de la bacteria, una que expresa el péptido y otra que no lo hace (ver figura 13). La vía de administración de la bacteria fue intranasal, dado que esta ruta ha demostrado eficiencia en la generación de respuesta inmune en el modelo murino.

Como control en el esquema de inmunización se empleó la bacteria que tenía el dominio β de MisL sin el epítipo bandera y en la gráfica se puede apreciar la negatividad de respuesta en sueros preinmunes y en el correspondiente a ratones inmunizados con la bacteria control. También se puede apreciar que el título de los sueros es de 1:360 (Gráfica 3).



**Gráfica 3.-** Titulación de los sueros de dos ratones hembra BALB/c que respondieron positivamente a la inmunización con  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Salmonella typhi* CVD908 pnrLTB(NANP)<sub>4</sub>βMisL por vía intranasal. La determinación se realizó mediante ELISA en placas sensibilizadas con péptido NANP sintético incubadas con los sueros de los ratones inmunizados con bacteria acarreadora.

**V.- Reconocimiento del antígeno en su forma nativa por los sueros de los ratones inmunizados con la construcción.**

En la figura 19 se aprecia la especificidad de los sueros inmunizados con el péptido acarreado por el autotransportador en *Salmonella typhi* CVD908, los que reconocen a la proteína circunsporozoítica presente en la superficie de esporozoitos de *P. falciparum* y que implica que el péptido (NANP)<sub>4</sub> translocado por el dominio  $\beta$  de MisL posee una disposición espacial muy similar a la de la CSP nativa.

**5.- Reconocimiento de la proteína circunsporozoítica nativa en la superficie de esporozoitos por los sueros de ratones inmunizados con *Salmonella typhi* como acarreadora del péptido (NANP)<sub>4</sub>**

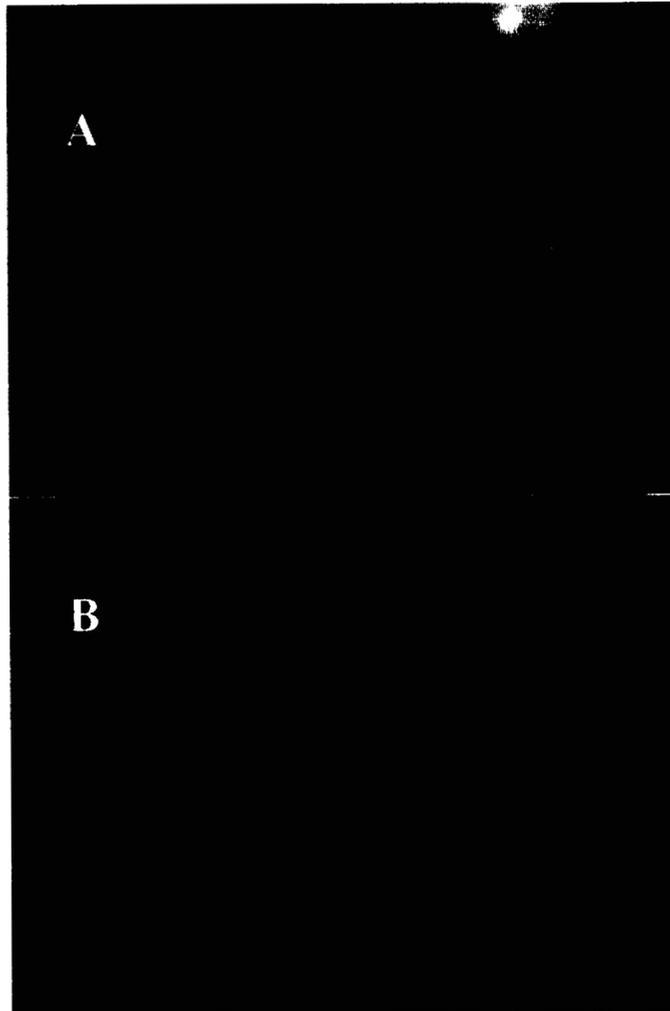


Figura 19.- Reconocimiento de la proteína circunsporozoítica (forma nativa de NANP) por los sueros de ratones inmunizados. Inmunofluorescencia indirecta realizada en laminillas con esporozoitos de *Plasmodium falciparum* fijados. Panel A) Incubados con el suero de ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 (NANP)<sub>4</sub>βMisL. Panel B) Incubados con el suero de ratones inmunizados con *Salmonella typhi* CVD908 βMisL. Aumento: 1000X

## DISCUSIÓN.

Los autotransportadores son moléculas que se clasifican dentro del último sistema de secreción de bacterias Gram-negativas<sup>(54, 55)</sup>. La gran mayoría de estas moléculas se localizan en islas de patogenicidad<sup>(59, 60)</sup> y están asociadas a virulencia<sup>(56, 59)</sup> o no se les conoce función<sup>(55)</sup>, este es el caso del gen *misL*. Este gen se describió al encontrarlo en la tercera isla de patogenicidad de *Salmonella typhimurium* y lo único que se conoce de él es la secuencia de aminoácidos inferida a partir de la secuencia nucleotídica; al compararlo con la base de datos, mostró una alta homología a miembros de la familia de la Proteasa de IgA, sobre todo en el extremo C-terminal, que corresponde al segmento translocador de la proteína<sup>(33)</sup>. Entre los autotransportadores hay diferencias en el tamaño del dominio translocador (283 aa para AIDA-1)<sup>(32)</sup>, (344 aa para VirG)<sup>(57)</sup>, (276 aa para Tsh de *E. coli*)<sup>(58)</sup>, (300 para sigA)<sup>(59)</sup>, teniendo en común la formación de un barril- $\beta$  que se inserta en la membrana externa y por el que pasa de manera lineal el dominio  $\alpha$  que es el que le dá la función a la proteína y que por lo tanto es el que más difiere en secuencia aminoacídica. Así, a VirG se le ha asociado a la focalización de proteínas de citoesqueleto de la célula huésped para la diseminación intercelular e intracelular de la bacteria<sup>(57)</sup>, a AIDA-1 se le atribuyen funciones de adhesina que favorece la diseminación de *E. coli* en sus células huésped<sup>(32)</sup>, respecto a proteasa de IgA, además de hidrolizar inmunoglobulina A humana, posee en su secuencia aminoacídica señales de localización nuclear reminiscentes a las de proteínas virales y eucarióticas, comparte varias características estructurales con factores de transcripción eucariotes (en dímeros) y *Neisseria gonorrhoeae* la secreta en grandes cantidades cuando coloniza la nasofaringe<sup>(61)</sup>.

Al existir tanta divergencia en los dominios funcionales de las moléculas autotransportadoras, es atractivo emplear los dominios translocadores de estas proteínas para la expresión de diversas moléculas pasajero en la superficie de bacterias o para su liberación al medio extracelular<sup>(32, 57, 62-66)</sup> ya que ofrecen la oportunidad de expresar proteínas cuya eficiente translocación depende del tamaño y de la secuencia primaria de aminoácidos. Se ha observado que las estructuras terciarias voluminosas ocasionadas por la formación de puentes disulfuro intramoleculares impiden la adecuada translocación a través del autotransportador por ejemplo, la expresión de PhoA mediada por VirG fue de 4.8 veces mejor cuando las bacterias se incubaron con 10 mM de 2-mercaptoetanol que sin 2-mercaptoetanol<sup>(57)</sup>; la subunidad B de la toxina colérica fue expresada cinco veces mejor (determinado por ELISA de células completas) empleando el dominio  $\beta$  de la proteasa de IgA en células cultivadas con 5 mM de 2-mercaptoetanol que sin este agente reductor<sup>(63)</sup>. La CtxB posee dos residuos de Cisteína, uno en la posición 9 y otro en la 86, lo cual al formarse un puente disulfuro, daría lugar a un asa

voluminosa o una estructura globular incapaz de cruzar la membrana, cuando se sustituyeron las dos cisteínas por leucina y glicina, CtxB se translocó eficientemente a pesar de la presencia o ausencia de 2-mercaptoetanol y resultados similares se obtuvieron cuando estaba presente un solo residuo de cisteína. Estos resultados dan lugar a la hipótesis de que cuando se cultiva sin 2-mercaptoetanol se forma una estructura inestable altamente susceptible a proteasas periplásmicas <sup>(63)</sup>. La suposición de que solo aquellas estructuras globulares muy voluminosas son las que no pueden translocarse a través del barril- $\beta$  explica los resultados obtenidos por Veiga, E. y cols. <sup>(66)</sup>; este grupo trabajó con la translocación de una fracción variable de una cadena (scFv) de inmunoglobulina con especificidad por proteínas que poseen histidinas en el C-terminal. Esta fracción reconoció su ligando de manera efectiva, evento que indicó la adecuada formación de puentes disulfuro que estabilizan el sitio de unión al antígeno. Aún así, esta fracción se expresó hasta 3 veces mejor en presencia de 2-mercaptoetanol <sup>(66)</sup>.

Los eventos descritos anteriormente condujeron al grupo de Meyer, T. a emplear una cepa de *E. coli* carente de la enzima DsbA que es la proteína que cataliza la formación de puentes disulfuro de proteínas que transitan en el periplasma <sup>(67)</sup> y logró una translocación eficiente mediada por el dominio  $\beta$  de la proteasa de IgA. En la secuencia primaria de los autotransportadores se reconocen residuos de cisteína que no forman estructuras globulares de difícil translocación ya que los residuos se encuentran separados por pocos aminoácidos entre sí, (11 aminoácidos en el caso de la proteasa de IgA <sup>(68)</sup>). En el caso de MisL, esta proteína no presenta en su estructura ningún residuo de cisteína, así que esto no representa un impedimento conformacional para la translocación de péptidos heterólogos (que no posean C en su secuencia) hacia la superficie celular bacteriana.

Para lograr una eficiente translocación de polipéptidos pasajeros heterólogos mediada por el dominio  $\beta$  de algún autotransportador, es importante emplear no solo la región formadora del barril- $\beta$ , sino también la región de unión o “linker” que pasa linealmente por el poro y que transporta el dominio  $\alpha$  hacia el exterior.

Existen diferencias en la longitud de estos segmentos entre los diferentes autotransportadores, así pues, la región de unión de AIDA-1 es de 20 aminoácidos <sup>(69)</sup>, la de VirG es de 45 aminoácidos <sup>(57)</sup> y la de proteasa de IgA pesa 15 Kda ( $\approx$  100 aminoácidos) <sup>(70)</sup>. Debido a estas diferencias, nosotros utilizamos un segmento mayor al que correspondería al dominio  $\beta$  de MisL, porque el péptido bandera que se empleó tan solo mide 18 aminoácidos y se corría el riesgo de no poder translocar un fragmento tan pequeño al exterior, pudiendo quedar embebido en el poro transmembranal. En base al modelo propuesto por Maurer, J y cols. <sup>(32)</sup>, se dibujó un modelo hipotético de la región empleada en este trabajo de la estructura que adquiere MisL en la membrana externa (Figura 20). En este modelo podemos apreciar:

- a) que el barril- $\beta$  está constituido de 14  $\beta$ -plegadas anfipáticas
- b) que la mayoría de los residuos de fenilalanina y de tirosina del barril- $\beta$  se localizan en el límite periplásmico o externo
- c) que las asas transmembranales que dan hacia el exterior de la células son más grandes que las que dan hacia el periplasma
- d) el residuo de fenilalanina C-terminal característico de proteínas embebidas en la membrana externa que se dirige hacia la porción periplásmica de la membrana externa

Estas características concuerdan con las halladas para el dominio  $\beta$  de la proteasa de IgA por Klauser, T. *et al.* <sup>(71)</sup>.

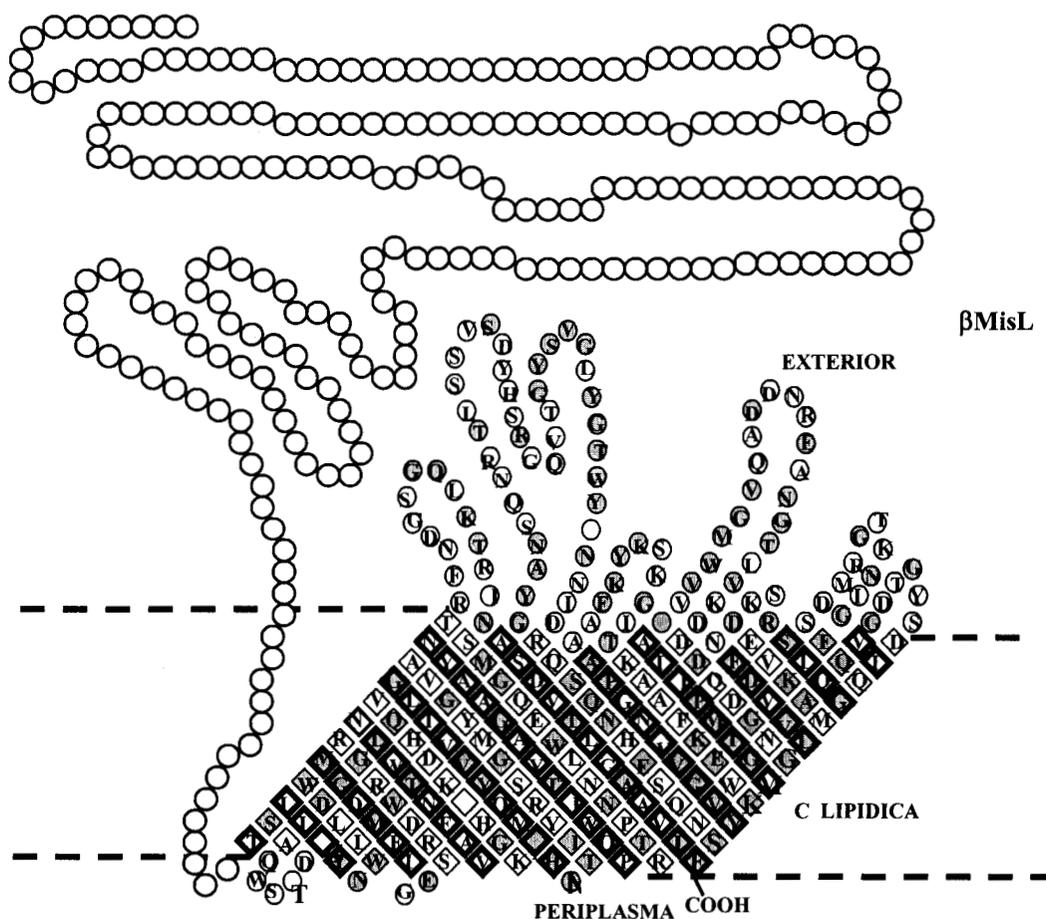


Figura 20.- Modelo hipotético de la estructura que forma el segmento translocador de MisL . En base al modelo topológico determinado para la proteína AIDA-I, se ha propuesto el siguiente modelo para la proteína MisL. Los aminoácidos que están marcados en color gris son conservados en AIDA-I y MisL. Los aminoácidos representados con cuadros de contorno oscuro representan los aa hidrofílicos y los de contorno claro corresponde a los aa hidrofóbicos. Los aa que se dirigen hacia la superficie o que no están embebidos en la membrana se representan con círculos.

Una vez que se evaluó la presencia del péptido (NANP)<sub>4</sub> en la superficie de *E. coli* DH5 $\alpha$  por diferentes metodologías y cuyos resultados fueron muy prometedores, se recurrió al uso de cepas atenuadas de *Salmonella* como acarreadores bacterianos para el péptido inmunogénico de *Plasmodium falciparum* y así evaluar la inmunogenicidad de (NANP)<sub>4</sub> translocado hacia la superficie por MisL.

Como antecedente, el uso de cepas de *Salmonella* atenuadas por bloqueo de la capacidad de síntesis de aminoácidos aromáticos ha sido de amplio interés <sup>(32, 72-74)</sup> y en nuestro grupo de trabajo se llegó a la aplicación de *S. typhi* CVD908 en ensayos clínicos para evaluar la inmunogenicidad de la proteína CSP de *P. falciparum* trunca, de localización citoplásmica. Los anticuerpos generados contra esta construcción no fueron específicos para el péptido NANP, a diferencia de los generados por la inmunización con *S. typhi* CVD908 NANP $\beta$ MisL, que reconocieron específicamente péptidos NANP por ELISA y a la proteína nativa en esporozoitos por inmunofluorescencia (Fig. 19 y Gráficos).

Este resultado puede deberse entre otras cosas, a la localización del antígeno en el acarreador bacteriano, ya que es más probable generar respuesta humoral cuando el antígeno está expuesto en la membrana que cuando tiene localización citosólica. Por otro lado, se ha demostrado que la ruta de inmunización intranasal empleada en este trabajo es mejor que la orogástrica para inducir respuesta humoral a antígenos en el modelo murino <sup>(75)</sup> y por último a las características del promotor empleado ya que este es un promotor fuerte e inducible *in vivo*, lo cual presenta ventajas en los ensayos de inmunización. Ahora bien, con respecto al número de ratones respondedores a la inmunización (2 de 5) podemos comentar que este evento correlaciona con lo observado por Barry, A y cols <sup>(42)</sup> en donde también tuvieron 2 de 5 ratones respondedores. Esto se explica por lo observado en la citometría de flujo, en donde hay dos subpoblaciones de *Salmonella typhi* CVD908 NANP $\beta$ MisL, una que expresa el epítipo en la superficie y otra (la mayoritaria) que no lo hace (Fig.18).

## CONCLUSIONES.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que MisL es un autotransportador (el primero descrito en el género *Salmonella*), ya que no requirió de factores accesorios especiales para su función translocadora. Esta función fue empleada para una eficiente translocación de péptidos heterólogos pasajeros.

El péptido recombinante mantiene una conformación tal que es reconocido por el AcMo anti-NANP 2A10

El epítipo expuesto en la membrana externa de *Salmonella typhi* CVD908 es capaz de generar respuesta humoral en ratones BALB/c

Los anticuerpos generados en los ratones inmunizados son capaces de reconocer la forma nativa del epítipo presente en la superficie de esporozoitos de *Plasmodium falciparum*.

Se demostró que el fragmento amplificado es suficiente para exportar el péptido heterólogo al medio extracelular, sin quedar embebido en la membrana externa o en el espacio periplásmico. Lo cual implica que se cuenta con el dominio  $\beta$  translocador, además de la región de unión del autotransportador. Se requiere de ensayos de delección en el extremo amino-terminal para así poder precisar con exactitud cuán largo es el dominio  $\beta$  de MisL

MisL es un excelente candidato para la expresión en la superficie de péptidos pasajeros heterólogos en bacterias Gram-negativas. Esta expresión tiene como posibles aplicaciones:

1. la producción de cadenas variables de inmunoglobulinas con diferentes especificidades
2. la exposición de ligandos o receptores para estudios de unión
3. la exposición de determinantes antigénicos para el desarrollo de vacunas recombinantes orales usando cepas bacterianas atenuadas.
4. Bibliotecas peptídicas para el mapeo de epítopos o ensayos de especificidad de anticuerpos
5. Exportación de proteínas biológicamente activas para uso biomédico y biotecnológico.

Debido a su buena expresión en sistemas heterólogos, Mis L puede ser una proteína autotransportadora empleada en diversos géneros de bacterias, lo cual abre la posibilidad de una mejor explotación biotecnológica y/o biomédica.

## REFERENCIAS.

- 1.- Fath, M., Kolter, R. "ABC transporters: bacterial exporters". *Microbiol Rev.* 1993, 57: 995-1017
- 2.- George P., Salmond, C., Philip, J. Reeves, J. "Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria". *TIBS* 1993, 18:7-12
- 3.- Arnold, J., Driessen, M., Fekkes, P., PW Van der Wolk. "The Sec system" *Curr Opin Microbiol* 1998, 1: 216-222
- 4.- Lee, C. A. "Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells". *Trends Microbiol* 1997,5:148-156
- 5.- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins". *Trends Microbiol* 1998, 6:370-378
- 6.- Thanassi, D.G., Hultgren, S.J."Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane". *Curr Opin Cell Biol.* 2000, 12:420-30
- 7.- Burns, D.L. "Biochemistry of the type IV secretion". *Curr Opin Microbiol.* 1999,2:25-9
- 8.- Fernández, L. A., Berenguer, J. "Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria" *FEMS Microbiol. Rev.* 2000 (24):21-44
- 9.- Wagner, W., Vogel, M., Goebel, W. "Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions". *J. Bacteriol.* 1983, 154: 200-10.
- 10.- Schneider, E. Hunke, S. "ATP-binding cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP hydrolyzing subunits domains". *FEMS Microbiol Rev.* 1998 (22):1-20
- 11.- Kenny, B., Haigh, R., and Holland, I.B. "Identification of individual amino acid required for secretion for within the haemolysin (HlyA) C-terminal targeting region". *Mol. Microbiol.* 1992, 8:1163-75
- 12.- Koronakis, V., Koronakis, E., and Hughes, C. "Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin across both bacterial membranes". *EMBO J.* 1989, 8:595-605
- 13.- Lowry, S. "Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: Shared pathways of extracellular protein targeting". *Curr. Op. Microbiol.* 1998, 1:27-35
- 14.- Hacker, J. Kaper, B. "Pathogenicity islands and the evolution of microbes". *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54:641-79
- 15.- Gentschev, I., Mollenkopf, H., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann S.H.E., and Goebel W. "Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway". *Gene*, 1996, 179: 133-40
- 16.- Gentschev, I., Sokolovic, Z., Mollenkopf, H.J., Hess, J., Kaufmann, S.H.E., Kuhn, M., Krohne, G. F., and Goebel, W. "*Salmonella* Strain Secreting Active Listeriolysin Changes its Intracellular Localization". *Infect. Immun.* 1995, 63: 4202-5
- 17.- Hueck, C J. "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants" *Microbiol, & Mol. Biol. Rev* 1998, Vol 62 No. 2:379-433

- 18.- Danese N, Silhavy T J. "Targeting and assembly of periplasmic and outer membrane proteins in *Escherichia coli*". *Annu. Rev. Gen.* 1998, 32:59-94
- 19.- Nunn, D. "Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies?" *Trends Cell Biol.* 1999, 9:402-8
- 20.- Galán, E. , Collmer, A. "Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells". *Science* 1999, 284:1322-1328.
- 21.- Rüssman H, Shams H, Poblete F, Fu Y, Galán J, Donis R. "Delivery of Epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development". *Science*, 1998. 281;565-568.
- 22.- Cornelis G, Van Gijsegem, F. "Assembly and function of type III secretory systems". *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54:735-74
- 23.- Cheng LW, Schneewind O. "Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods" *Trends Microbiol.* 2000 Vol 8 (5):214-20
- 24.- Christie, P.J, Vogel JP. "Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells" *Trends Microbiol.* Vol 8(8):354-60
- 25.-Min, E., Kado, CL. "The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*". *Trends Microbiol.* Vol.8 (8):361-8
- 26.- Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion" *Science.* 2000,287:1497-1500
- 27.- Stein M, Rappuoli R, Covacci A. "Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation". *Proc. Natl Acad. Sci.* 2000, 97 (3):1263-8
- 28.- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer F. "Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease". *Nature* 1987, 325:458-62
- 29.- Joachim J, Fritz J, Meyer F."Common structural features of IgA protease-like outer membrane protein autotransporters". *Mol Microbiol* 1995, 18: 377-82
- 30.- Henderson I R, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro J. "Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*". *Infec Immun* 1999, 67; 5587-96.
- 31.- Klauser T, Kramer J, Oetzberger K, Pohlner J, Meyer T F. "Characterization of the *Neisseria* Iga $\beta$ -core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion". 1993, 234:574-93.
- 32.- Maurer J, Joachim J, Meyer T F. "Autodisplay; one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*". *J Bact.* 1997. 794-804
- 33.- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. "The SPI-3 Pathogenicity island of *Salmonella enterica*". *J Bact* 1999, 181:998-1004
- 34.- Hone, D. M., Shata, M. T. Pascual, W. D. Lewis, G. K.(1999) Chapter 6. Mucosal vaccination with *Salmonella* vaccine vectors. In: Intracellular bacterial vaccine vectors: Immunology, Cell Biology and Genetics. Ed. Yvonne Paterson. Wiley-Liss.

- 35.- Gonzalez, C.R., Noriega, F., Huerta, S., Santiago, A., Vega, M., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A., Levine, M.M. "Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*". *Vaccine*. 1998, 16(9-10):1043-52.
- 36.- González, C., Hone, D., Noriega, F., Tacket, C., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Sztein, M., Heppner, G., Fouts, T.R., Isibasi, A., Levine, M.M. "*Salmonella typhi* Strain CVD908 Expressing the Circumsporozoitic Protein of *Plasmodium falciparum* : Strain Construction, Safety and Immunogenicity in Humans". *J. Infect. Dis.* 169:927-931, 1994.
- 37.- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1982.
- 38.- Van der Waaij, L.A., Mesander, G. Limburg, P. C, Van der Waaij, D. "Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces". *Cytometry*, 1994, 16:270-279
- 39.- Robertson, B R. Button D. K. "Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size and apparent DNA content by flow cytometry". *Cytometry*, 1989, 10:70-76
- 40.- Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 227:680-685, 1970.
- 41.- Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. "Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var Typhimurium" *Infect. Immun.* 1999, 67 (10):5133-41
- 42.- Barry, EM, Gómez-Duarte O, Chatfield S, Rappuoli R, Pizza M, Losonsky G, Galen J, Levine MM. "Expression and immunogenicity of Pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908". *Infect. Immun.* 1996, 64(10):4172-81
- 43.- Wandersman C, Delepelaire P. "TolC, an outer *E. coli* membrane protein required for hemolysin secretion". *Proc. Natl. Acad. Sci* 1990, 87:4776-80
- 44.- Bielecki, A, Youngman P, Connelly P, Portnoy D. "*Bacillus subtilis* expressing  $\alpha$ -haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells". *Nature* 1990, 345: 175-6
- 45.- Higgins D, Shastri N, Portnoy D. "Delivery of protein to the cytosol of macrophages using *E. coli* K-12" *Mol. Microbiol.* 1999, 31(6):1631-41
- 46.- Galán J E. "Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells". *Mol. Microbiol.* 1996, 20(2):263-71
- 47.- Henderson IA, Nataro J., "Virulence functions of autotransporter proteins". *Infect. & Immun.* 2001, 69(3):1231-43
- 48.- Newton S, Jacob Ch, Stocker B. "Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin". *Science* 1989, 244:70-2
- 49.- O'Callaghan D, Charbit A, Martineau P, Leclerc C, Van der Werf S, Nauciel C, Hofnung M. "Immunogenicity of foreign peptide epitopes expressed in bacterial envelope proteins" *Res. Microbiol.* 1990, 141:963-69

- 50.- Charbit A, Molla A, Saurin W, Hofnung M. "Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria". *Gene* 1988, 70:181-9
- 51.- Georgiou G, Stathopoulos Ch, Daugherty P, Nayak A, Iwerson B, Curtis III R. "Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines". *Nature Biotech.* 1997, 15:29-34
- 52.- Stocker B. "Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines" *Nature* 1981, 291:238-9
- 53.- Hone D, Harris A, Chatfield S, Dougan G, Levine M. "Construction of genetically defined double *aro* mutants as *Salmonella typhi*". *Vaccine* 1991, 9:810-6
- 54.- Henderson I, Nataro J, Kaper J, Meyer T, Farrand S, Burns D, Finlay B. "Renaming protein secretion in the Gram-negative bacteria" *Trends Microbiol.* 2000 8(8):352-3
- 55.- Henderson I, Cappello R, Nataro J. "Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion" *Trends Microbiol.* 2000, 8(12):529-32
- 56.- Kingsley R, Amsterdam K, Kramer N, Bäuml A. "The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding" *Infect. & Immun.* 2000, 68(5):2720-7
- 57.- Suzuki T, Lett MC, Saskawa Ch. "Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*" *J. Biol. Chem.* 1995, 270(52):30874-80
- 58.- Stathopoulos Ch, Provence D, Curtis III R. "Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the IgA protease-type family of autotransporters" *Infect. & Immun.* 1999, 67(2):772-81
- 59.- Hasani K, Henderson I, Sakellaris H, Rajakumar K, Adler B, Nataro J. "The *sigA* gene which is borne on the *she* pathogenicity island of the *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation" *Infect. & Immun.* 2000, 68(5):2457-63
- 60.- Henderson I, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro J. "Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*" *Infect. & Immun.* 1999, 67(11):5587-96
- 61.- Pohlner J, Langenberg U, Wölk U, Beck S, Meyer T. "Uptake and nuclear transport of *Neisseria* IgA1 protease-associated  $\alpha$ -proteins in human cells" *Mol. Microbiol.* 1995, 17(6):1073-83
- 62.- Latteman C, Maurer J, Gerland E, Meyer T. "Autodisplay: functional display of active  $\beta$ -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-1 autotransporter". *J. Bact.* 2000, 182(13):3726-33
- 63.- Klauser T, Pohlner J, Meyer T. "Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease  $\beta$ -domain: conformation dependent outer membrane translocation" *EMBO J.* 1990, 9(6): 1991-9
- 64.- Klauser T, Pohlner J, Meyer T. "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga $\beta$ -mediated outer membrane transport". *EMBO J.* 1992, 11(6): 2327-35

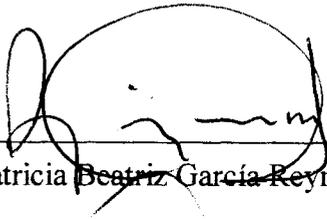
- 65.- Strauss A, Pohlner J, Klauser T, Meyer T. "C-terminal glycine-histidine tagging of the outer membrane protein Iga $\beta$  of *Neisseria gonorrhoeae*". FEMS Microbiol. Lett. 1995, 127:249-54
- 66.-Veiga E, Lorenzo V, Fernández L. "Probing secretion and translocation of a  $\beta$ -autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain". *Mol. Microbiol.* 1999, 33(6):1232-43
- 67.- Jose J, Krämer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer T. "Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cystein-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga $\beta$  autotransporter pathway" *Gene* 1996 (178):107-10
- 68.- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer T. "Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria* IgA protease" *Nature* 1987, 325:458-62
- 69.- Maurer J, Jose J, Meyer T "Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter, evidence supporting structural predictions" *J. Bact.* 1999, 181 (22):7014-20
- 70.-Klauser T, Pohlner J, Meyer T. "The secretion pathway of IgA protease-type proteins in Gram-negative bacteria" *BioEssays* 1993, 15(12):799-805
- 71.- Klauser T, Kramer J, Otzelberger K, Pohlner J, Meyer T. "Characterization of the *Neisseria* Iga $\beta$ -core: the essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion" *J. Mol. Biol.* 1993, 234:574-93
- 72.- Wu S, Beier M, Sztein MB, Galen J, Pickett T, Holder A, Gomez-Duarte O, Levine MM. "Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C" *J. Biotechnol.* 2000, 83 (1-2):125-35
- 73.- Stocker B. "Aromatic-dependent *Salmonella* as antibacterial vaccines and as presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them" *J. Biotechnol.* 2000, 83(1-2):45-50
- 74.- Roberts M, Chatfield S, Pickard D, Li J, Bacon a. "Comparison of abilities of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AroA AroD *htrA* mutants to act as live vectors". *Infect. & Immun.* 2000, 68(10):6041-3
- 75.- Galen J, Gomez-Duarte O, Losonsky G, Halpern J, Lauderbaugh C, Kaintuck S, Reymann M, Levine MM. "A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens" *Vaccine* 1997, 15(6-7):700-7

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 31 de mayo de 2001.



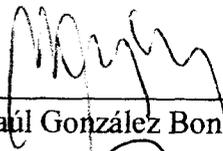
---

Dr. Rubén Darío Martínez Pérez  
Presidente



---

M. en C. Patricia Beatriz García Reyna  
Secretario



---

Dr. César Raúl González Bonilla  
1<sup>er</sup> Vocal



---

M. en C. Fernando Ruiz Pérez  
2<sup>o</sup> vocal

---