

Tesis de Licenciatura

Desarrollo de un nuevo Carrier antigénico por ingeniería de proteínas para su uso en vacunas acelulares

Laplagne, Diego A.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Laplagne, Diego A.. (). Desarrollo de un nuevo Carrier antigénico por ingeniería de proteínas para su uso en vacunas acelulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000875_Laplagne

Cita tipo Chicago:

Laplagne, Diego A.. "Desarrollo de un nuevo Carrier antigénico por ingeniería de proteínas para su uso en vacunas acelulares". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000875_Laplagne

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DE LICENCIATURA

DESARROLLO DE UN NUEVO CARRIER
ANTIGÉNICO POR INGENIERÍA DE PROTEÍNAS
PARA SU USO EN VACUNAS ACELULARES

Diego A. Laplagne

Director: Fernando A. Goldbaum

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS - FCEYN, UBA

Noviembre de 2002

Agradecimientos

A mi director y maestro Fernando Goldbaum y a Diego Ferreiro y Daniel Goldstein, por devolverme a la ciencia.

A mis viejos, por no decirme lo que tenía que hacer.

A Diani, mi “mujer del hombre de ciencia”.

A los chicos y chicas del viejo 207-209: Ale, Ana, Cristian, Diego, Gabriel, Guille, Juan Manuel, Laura, Leo, María, María Laura, Mariela, Natalia, Santiago, Sebastián y Vane.

A mis amigos.

A la gente del Instituto, por la paciencia.

A los buenos docentes que tuve el gusto de conocer.

A los argentinos, por mantener la educación pública y gratuita a pesar de todo.

RESULTADOS	22
CREACIÓN DE GENES QUIMÉRICOS	22
ESTRATEGIA	22
DESARROLLO DEL CASSETTE	22
OBTENCIÓN DE LOS GENES QUIMÉRICOS	25
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	29
ENSAYOS DE EXPRESIÓN EN ESCALA PEQUEÑA	29
EXPRESIÓN, REPLEGADO Y PURIFICACIÓN DE LS-OMP31	30
ESTRUCTURA Y ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	33
ESTRUCTURA	33
ESTABILIDAD	34
Curvas de desnaturalización al equilibrio	35
Análisis termodinámico de las curvas de desnaturalización	36
Desnaturalización térmica	40
ANTIGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	41
ANTIGENICIDAD	41
INMUNOGENICIDAD	42
Inmunización de ratones	42
Inmunización de conejo	44
QUIMERAS MIXTAS	46
PROYECCIONES DEL TRABAJO	51
BRUCELOSIS (LS-OMP31)	51
SARAMPIÓN (LS-MEAL Y LS-MEAM) Y VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL (LS-RSVM)	54
CISTICERCOSIS (LS-KETc1, LS-KETc12 Y LS-GK1)	56
CONCLUSIONES	57
CONSTRUCCIÓN DE LOS GENES QUIMÉRICOS	58
EXPRESIÓN DE LAS QUIMERAS	58
PURIFICACIÓN DE LAS QUIMERAS	59
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	59
INMUNOGENICIDAD DE LS-OMP31	60
QUIMERAS MIXTAS	60
DISCUSIÓN	62
REFERENCIAS	64

INTRODUCCIÓN

o

Vacunas

La historia de la vacunación experimental propiamente dicha comienza con los trabajos clásicos de Edward Jenner y Louis Pasteur, a finales del siglo XVIII y comienzos del XIX. Jenner demuestra en 1796 la efectividad de la inoculación en humanos de virus de viruela vacuna como estrategia de protección contra la viruela humana. Pasteur prueba así mismo que bacterias de *Pasteurella septica* y cepas del virus de la rabia, debidamente atenuadas, son capaces de proteger contra las respectivas patologías a individuos inmunizados.

Desde entonces, la mayoría de las vacunas desarrolladas fueron atenuadas por pasos sucesivos por cultivo o inactivadas por medios químicos o físicos. Esta restricción no obedece exclusivamente a limitaciones tecnológicas: los microorganismos son capaces de inducir fuertes respuestas humorales y celulares contra una compleja variedad de antígenos. En el caso de organismos vivos, la permanencia latente del microorganismo contribuye a la persistencia en el tiempo de la protección. Este tipo de vacunas presenta sin embargo altos riesgos para la salud de los individuos inmunizados. Para vacunas vivas, la lesión genética responsable de la atenuación del agente permanece en general desconocida, existiendo entonces riesgo de reversiones espontáneas de la patogenicidad del agente. Las vacunas muertas presentan también riesgos potenciales: inactivaciones incompletas son capaces de producir enfermedad (Corbel 1996). A su vez, el proceso de inactivación puede desnaturalizar proteínas antigénicas reduciendo la efectividad de la vacuna (Ellis 1996).

Vacunas acelulares

Las consideraciones de seguridad mencionadas, junto con el notable desarrollo de la biología molecular, desplazaron el foco de interés hacia las vacunas acelulares. Las ventajas de este tipo de inmunógenos son su bajo riesgo (por tratarse de sustancias purificadas, incapaces de multiplicarse en el individuo) y la posibilidad de un control más fino y racional de los epítopes utilizados. Estas comprenden las vacunas de ADN, peptídicas y proteicas.

Las **vacunas de ADN** involucran la administración de ácidos nucleicos desnudos, cuya secuencia codifica para antígenos proteicos de interés. Se ha descrito que los genes así presentados son expresados luego por las propias células del individuo inmunizado (Wolff 1990). Su bajo costo y su capacidad de inducir respuestas tanto humorales como celulares ha generado gran interés en esta vía de inmunización, y vacunas de ADN están siendo ya sometidas a pruebas clínicas en humanos (Nossal 1998).

Se llama **vacunas peptídicas** a aquellas en las que el o los antígenos son oligopéptidos pequeños obtenidos por síntesis química. Estos péptidos corresponden por lo general a epítopes lineales tomados de la estructura primaria de proteínas del patógeno contra el cual se busca proteger. Se utilizan también péptidos capaces de mimetizar la superficie tridimensional de epítopes discontinuos ("mimotopes"), los cuales se obtienen necesariamente por *screening* de bibliotecas combinatoriales (Olszewska 2000; Steward 2001). Los péptidos en solución son sin embargo pobres inmunógenos, lo que hace necesario su unión a moléculas presentadoras o *carriers* y el uso de sustancias adyuvantes capaces de incrementar la respuesta. A su vez, el alto costo de la síntesis química de péptidos restringe su implementación como vacunas de uso masivo.

El uso de **proteínas** como inmunógenos comparte parcialmente los problemas de costo y baja inmunogenicidad propios de las vacunas peptídicas. La administración de proteínas solubles no es por lo general suficiente para generar una respuesta inmune fuerte (Nieba 2000), por lo que se hace necesario el uso de sustancias adyuvantes, cuya toxicidad previene su uso en humanos.

Relación estructura-inmunogenicidad

Existen sin embargo proteínas capaces de inducir respuestas inmunes fuertes en ausencia incluso de adyuvantes. ¿Qué hace que estas proteínas sean tan inmunogénicas? Diversas líneas de investigación sugieren la existencia de una relación entre la estructura de un antígeno y su inmunogenicidad.

Los primeros estudios en este sentido, realizados en la década de 1970, utilizaron haptenos como antígenos modelo. Se llama **haptenos** a aquellas moléculas susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos, pero incapaces de inducir por sí mismas respuestas

inmunes adaptativas. Para generar anticuerpos contra haptenos estos deben ser conjugados con moléculas transportadoras o *carrier*. Trabajos con haptenos conjugados de forma polimérica a moléculas polivalentes mostraron que arreglos de 20 a 30 haptenos, espaciados de manera óptima por 5 a 10 nanómetros, son capaces de activar linfocitos B aún en ausencia de linfocitos T (Dintzis 1976). Este tipo de antígenos se denominan T-independientes (TI). En rigor, estos polímeros lineales requieren al menos niveles bajos de actividad T (correspondiendo entonces a la clase TI tipo 2), pero se hacen completamente independientes (clase TI-1) si en lugar de utilizar un polímero flexible se presenta al hapteno en un arreglo bidimensional rígido, cuasicristalino.

Las proteínas de cápside y envoltura viral constituyen el modelo por excelencia para el estudio de la relación estructura-inmunogenicidad en antígenos protéicos. Estas proteínas purificadas son capaces de formar cápsides nativas huecas, las cuales se conocen como *Virus Like Particles (VLPs)*. Martin Bachman y Rolf Zinkernagel establecieron una correlación entre el grado de repetitividad de un epítipo y la eficiencia de la respuesta B específica inducida trabajando con una proteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Bachmann 1993; Bachmann 1994; Bachmann 1995). Este virus posee una envoltura, la cual contiene una única proteína (VSV-G), expresada en alta densidad y en una disposición ordenada con distancias de 5 a 10 nm entre los monómeros. Los autores inmunizaron ratones con esta proteína dispuesta de tres maneras: (1) formando una envoltura viral, de disposición cuasicristalina, (2) formando micelas de composición y estructura variable o (3) como monómeros de proteína soluble (Fig. 1). De esta manera pudieron determinar que cuanto mayor es el grado de organización estructural, mayor es la respuesta humoral inducida. Así, la muestra (1) se comporta como un antígeno TI-1 y la (2) como TI-2, mientras que la (3) es totalmente incapaz de activar linfocitos B.

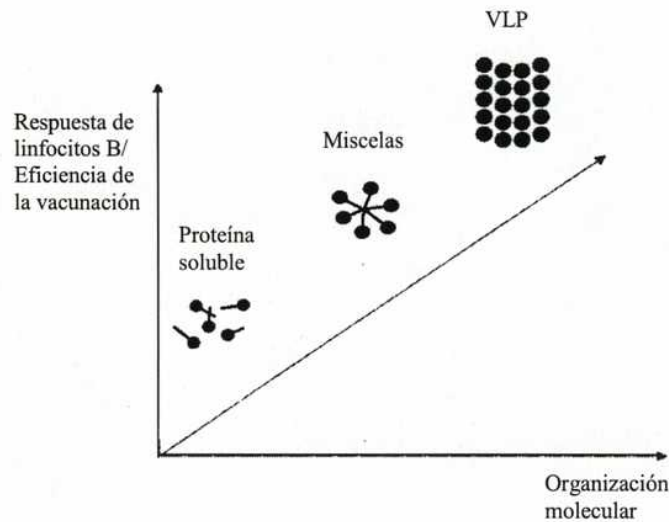


Figura 1. Correlación entre el grado de organización de la proteína VSV-G y la respuesta inmune humoral inducida (Modificado de Bachmann MF, 2000).

Esta relación entre la repetitividad y el ordenamiento de un epítipo y su inmunogenicidad estaría mediada en parte por la capacidad propia de estas estructuras de promover el entrecruzamiento de las inmunoglobulinas receptores en la membrana de los linfocitos B específicos (Bachmann 1995).

La alta inmunogenicidad de las proteínas de cápside viral despertó interés en aprovecharlas para el desarrollo de inmunógenos y vacunas acelulares. El ejemplo más exitoso en este sentido es la actual vacuna contra el virus de la hepatitis B, la cual consiste de VLPs obtenidas por expresión en levaduras de la proteína S de la cápside viral (Valenzuela 1982; Raz 1996). Se ha probado también modificar por ingeniería genética los genes clonados de estas proteínas de manera de producir proteínas quiméricas capaces de presentar eficientemente al sistema inmune péptidos de orígenes diversos. La proteína L1 de la cápside del virus HPV-16 fue ensayada como carrier de un péptido correspondiente a un epítipo neutralizante de HIV-1. El péptido (de 8 aminoácidos) se insertó en bucles expuestos de la proteína. Algunas de las quimeras ensayadas fueron capaces de inducir anticuerpos contra el péptido insertado pero los sueros obtenidos no fueron útiles sin embargo para neutralizar al virus HIV-1. Esto podría deberse a que el

péptido no adopte en el contexto de la proteína L1 su conformación nativa. A su vez, la inmunización con la quimera desnaturalizada no produjo respuesta, confirmando que la inmunogenicidad es conferida al péptido por la estructura del carrier.

Otras VLPs han sido ensayadas como carriers de péptidos, incluyendo la propia del virus de la hepatitis B (Borisova 1996; Fehr 1998). Para esto debieron realizarse diversos análisis estructurales de manera de predecir sitios donde poder insertar péptidos sin perturbar el correcto plegamiento y ensamblaje de las VLPs. Aunque péptidos de hasta 100 aminoácidos (y hasta la proteína GFP completa (Kratz 1999)) fueron exitosamente insertados, son comunes casos en que la inserción aún de péptidos tan cortos como de 5 aa perturban la estructura impidiendo la formación de VLPs y/o reduciendo sensiblemente su inmunogenicidad (Fehr 1998; Yuan 2001).

La relación estructura-inmunogenicidad no es propiedad exclusiva de las grandes partículas virales. La proteína L1 ya mencionada fue expresada alternativamente en *E. coli* obteniéndose en forma pentamérica regular en lugar de obtenerse la VLP característica (Yuan 2001). Este pentámero soluble, a pesar de ello, conserva sus epítopes neutralizantes y es capaz de proteger eficientemente contra la infección viral. La repetitividad de un epítipo protéico mostró ser determinante también usando β -galactosidasa de *E. coli* como carrier. A esta proteína monomérica se le insertó un péptido en uno de sus bucles expuestos, en otro distinto, o en los dos bucles en simultáneo y se encontró que la doble inserción produjo un efecto sinérgico sobre la respuesta humoral comparado con las inserciones simples (Feliu 2000).

Es habitual en la práctica inmunológica el uso de estrategias que resultan en un aumento del tamaño, el grado de polimerización o el orden de los antígenos (agregación, entrecruzamiento químico, conjugación a proteínas como la albúmina, etc.). Estos procedimientos aumentan por regla general la respuesta inmune inducida, posiblemente por razones similares a las relativas a la alta inmunogenicidad de las VLPs.

La Lumazina Sintetasa de *Brucella* spp.

La brucelosis es una antropozoonosis causada por la bacteria intracelular facultativa *Brucella* spp. y constituye un importante problema económico y sanitario en países en

desarrollo. La búsqueda de proteínas citoplasmáticas de *Brucella* potencialmente útiles en el desarrollo de ensayos de diagnóstico por ELISA llevó a la identificación de una proteína de 18 KDa presente en todas las especies del género (Goldbaum 1992; Goldbaum 1993). La secuencia aminoacídica de esta proteína (Hemmen 1995) resultó homóloga a la de la familia de las lumazina sintetetasas, siendo esta relación confirmada por ensayos de actividad enzimática (Goldbaum 1999).

La lumazina sintetasa de *Brucella spp.* se produce en forma recombinante en bacterias *E. coli*, obteniéndose rendimientos de hasta 40mg por litro de cultivo por replegado de la fracción de cuerpos de inclusión (cita).

Estructura

Las proteínas de la familia de las lumazina sintetetasas presentan una estructura terciaria altamente conservada a pesar de la relativamente baja homología de secuencia entre las mismas (Fig. 2). El monómero de estas proteínas presenta un peso molecular aproximado de 18 KDa.

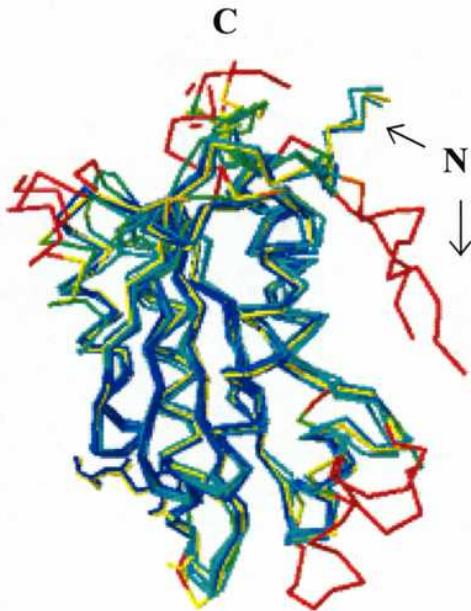


Figura 2. Alineamiento estructural entre los monómeros de lumazina sintetasa de *B. abortus*, *Bacillus subtilis*, *Aquifex aeolicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Magnaporthe grisea* y *Spinacea oleracea*. Se muestra sólo el trazado de carbonos

alfa. Las posiciones de mayor y menor divergencia estructural se indican en rojo y azul respectivamente. Se señala la ubicación de los extremos amino y carboxi-terminales (“C” y “N”). Se observa una superposición casi perfecta de las regiones que conforman el núcleo protéico.

La estructura cuaternaria difiere, sin embargo, entre las distintas lumazina sintetetas. En *B. subtilis*, la lumazina sintetasa/riboflavina sintetasa existe como un complejo de 60 subunidades de LS dispuestas en 12 pentámeros formando una cápside de simetría icosaédrica, asociada a 3 subunidades de rivo flavina sintetasa (Fig. 3) (Ritsert 1995).

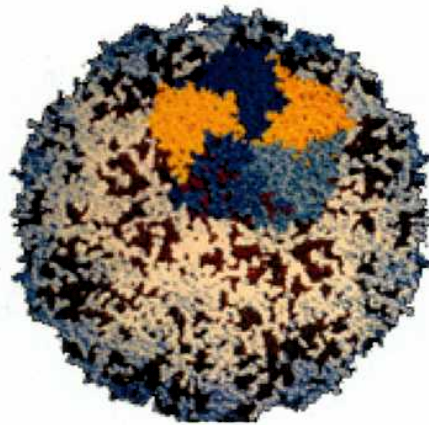


Figura 3. Estructura icosaédrica de la LS de *B. Subtilis*. Se destaca uno de los pentámeros constituyentes.

Las LS de *Escherichia coli*, *A. aeolicus* y *S. oleracea*, por su parte, forman partículas icosaédricas similares a *B. subtilis* pero sin que se encuentren asociadas a la riboflavina sintetasa (Mortl 1996; Persson 1999; Zhang 2001). Por último, las LS de *B. abortus*, *S. cerevisiae*, *M. Grisea* y *Schizosaccharomyces pombe* forman estructuras pentaméricas equivalentes a las que conforman las partículas en los organismos antes mencionados, sólo que estas no se asocian en forma de icosaedros sino que permanecen como pentámeros aislados (Fig. 4) (Persson 1999; Braden 2000; Meining 2000; Fischer 2002).

Figura 4. Estructura pentamérica de la LS de *B. abortus*. Se muestran los monómeros en distintos colores (modo “wireframe”, backbone y cadenas laterales). Se señala en rojo los primeros tres residuos del extremo N-terminal con densidad electrónica definida para cada monómero.

Estabilidad

El 35% de la superficie de cada monómero de la lumazina sintetasa de *Brucella spp.* (BLS) se encuentra involucrada en contactos con sus dos monómeros adyacentes en el pentámero. Esto sugiere que la BLS es una proteína altamente estable. Estudios en curso confirman su alta estabilidad, tanto frente a desnaturalización química como térmica. En particular, BLS no es desnaturalizada por urea 8M a pH neutro y presenta un Tm aparente (temperatura de desnaturalización media) de 87°C.

Inmunogenicidad

La lumazina sintetasa de *Brucella spp.* es una proteína altamente inmunogénica. Sueros de animales infectados con distintas especies de *Brucella* presentan una alta reactividad contra la misma (Goldbaum 1993). La inmunización experimental con LS recombinante induce respuestas humorales fuertes y perdurables aún en ausencia de adyuvantes (Fig. 5) (Velikovsky 2002).

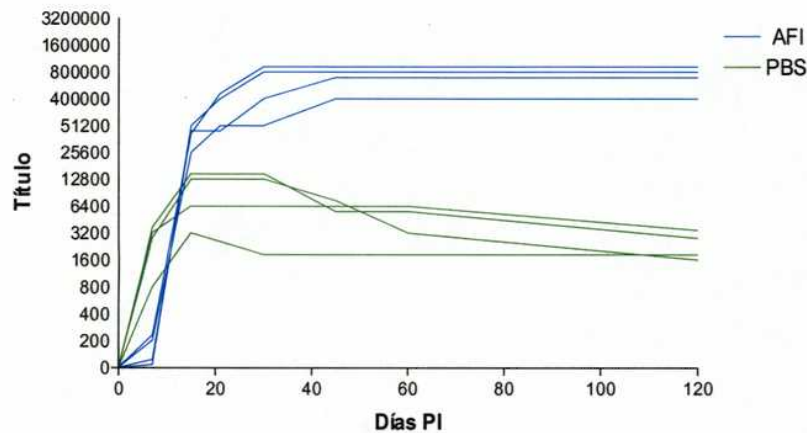


Figura 5. Evolución del título de anticuerpos totales contra LS en ratones inmunizados con LS en Adyuvante de Freund Incompleto (AFI) o en PBS (PBS). Cada línea representa la respuesta de un ratón individual. (Velikovsky, Tesis Doctoral).

Por otro lado, el uso de adyuvantes puede modular al sistema inmune de manera de inducir una respuesta celular. En particular, el uso del adyuvante MPL/TDM resulta en una fuerte respuesta celular antígeno específica.

La inmunización con LS fue ensayada también como vacuna de ADN. Ratones a los que se inyectó un vector viral eucariota portador del gen de la LS desarrollaron fuertes respuestas humorales y celulares específicas y resultaron parcialmente protegidos contra la infección experimental con *B. abortus* (Velikovsky 2002).

Extremo N-terminal

Distintas evidencias sugieren que el extremo N-terminal de las lumazina sintetasas pentaméricas no contribuye a la estructura del estado nativo:

- La estructura cristalográfica de la proteína de *B. abortus* no presenta densidad electrónica definida para los primeros 10 aminoácidos de cada monómero (Fig 4).

- La estructura obtenida para la LS de *S. cerevisiae* muestra extremos N-terminales flexibles, de estructuras estabilizadas por contactos cristalográficos (Meining 2000).
- Deleciones parciales del N-terminal de esta última no causan pérdida de actividad enzimática (Meining 2000).
- Mientras que en las LS icosaédricas este extremo adopta una estructura de hoja beta, en las variantes pentaméricas no presentan estructura secundaria definida (Gerhardt 2002).

En virtud también de la alta estabilidad ya mencionada, estos resultados sugieren que sería en principio posible reemplazar el extremo N-terminal de BLS sin comprometer su plegamiento y estabilidad.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es evaluar la factibilidad del uso de la lumazina sintetasa de *Brucella spp.* como *carrier* antigénico.

Para ello se planea contruir proteínas quiméricas, reemplazando por técnicas de ingeniería genética el extremo N-terminal de la proteína recombinante por péptidos foráneos contra los cuales se espera inducir respuesta inmune específica.

La hipótesis que se plantea es que al ser presentados los antígenos de esta manera, se generará una fuerte respuesta inmune específica humoral y posiblemente celular en los animales inmunizados. Esta hipótesis encuentra las siguientes justificaciones:

- BLS es una proteína altamente inmunogénica. Animales inmunizados con BLS recombinante desarrollan una fuerte respuesta de anticuerpos contra la misma. El "efecto adyuvante" de esta proteína aumentaría entonces la respuesta contra los péptidos insertados.
- Los péptidos insertados se presentarían en forma polimérica y regular al sistema inmune, una disposición que se ha demostrado favorable para la activación de la respuesta por linfocitos B.
- BLS produce respuestas humorales fuertes aún en ausencia de adyuvantes, por lo que se espera un comportamiento similar para los péptidos insertados.
- BLS presenta una alta estabilidad y extremos N-terminales flexibles que no contribuyen a su estructura nativa. De esta manera, el reemplazo de este fragmento de la proteína no comprometería, en principio, su plegamiento ni su estabilidad.
- BLS se produce en forma recombinante con muy alto rendimiento. Al no verse afectado el plegamiento de las quimeras, se espera obtener niveles de expresión similares para las mismas.
- Mediante el uso de adyuvantes es posible inducir una respuesta inmune celular contra BLS. Se espera poder obtener entonces respuestas de este tipo contra los péptidos insertados.

Objetivos puntuales

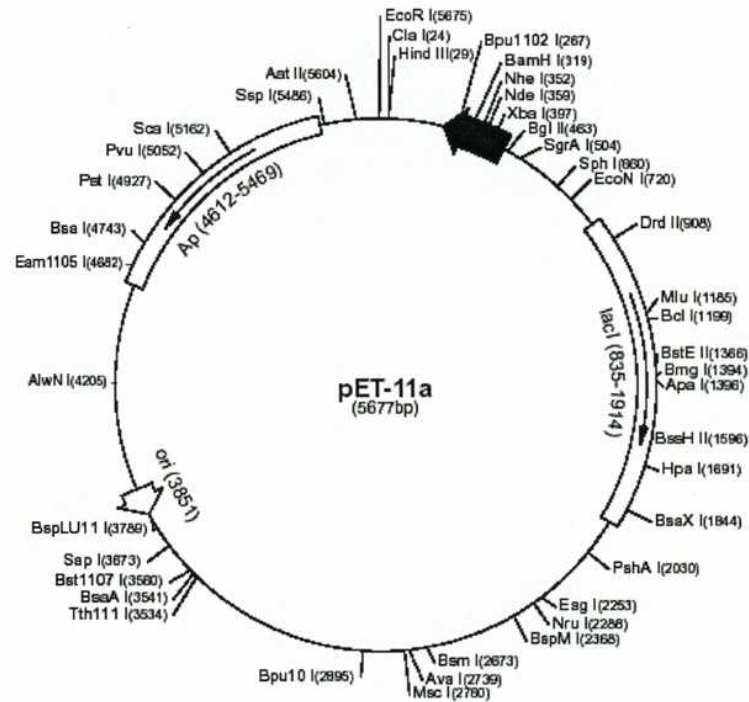
1. Reemplazar por técnicas de ingeniería genética el extremo 5' del gen de BLS, el cual codifica para su extremo N-terminal, por la secuencia de ADN que codifica para un loop potencialmente expuesto de la proteína integral de membrana de *Brucella melitensis* Outer Membrane Protein 31 (OMP31).
2. Expresar la proteína quimérica en bacterias *E. coli* y purificarla.
3. Realizar estudios comparativos de estabilidad entre la quimera (LS-OMP31) y la proteína *wild-type* (LS-WT) de manera de averiguar si el reemplazo del extremo N-terminal compromete de alguna manera a la misma.
4. Estudiar la inmunogenicidad del péptido presentado en la quimera. Ensayar para esto la reactividad de los sueros de animales inmunizados con la quimera contra OMP31, la proteína de la cual proviene la secuencia del péptido.
5. Construir, expresar y purificar nuevas quimeras de manera de evaluar el rango de aplicabilidad del sistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Subclonado y mutagénesis del gen de LS

Se realizó el subclonado del gen de LS desde el plásmido de expresión pET11a (Novagen, Fig. 1-A) al plásmido para mutagénesis pALTER-Ex1 (Promega, Fig. 1-B).

A



B

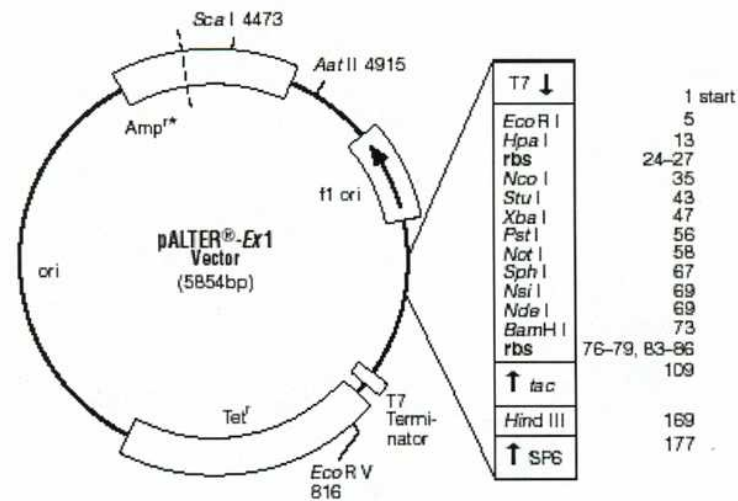


Figura 6. Mapa de los plásmidos pET-11a (A) y pALTER-Ex1 (B).

El subclonado se realizó entre los sitios de corte de las enzimas de restricción Xba I (New England Biolabs) y BamHI (Promega). Las digestiones se realizaron en simultáneo en Buffer E (Promega), BSA 0,1 mg/ml. Insertos y plásmidos se purificaron de gel por GeneClean (Bio 101) y se ligaron con ADN ligasa T4 (Promega). La mutagénesis se realizó según el protocolo Altered Sites II (Promega). LS-2MUT (descrito en Resultados) se subclonó a pET-11a siguiendo los mismos métodos. Los subclonados se confirmaron por ensayo de restricción Xba I/BamH I y secuenciación del marco de lectura completo.

Construcción, expresión y purificación de proteínas quiméricas

Se detallan a continuación los protocolos utilizados a lo largo de la obtención de cada proteína quimérica. Los mismos se encuentran en el orden lógico en que se realizan.

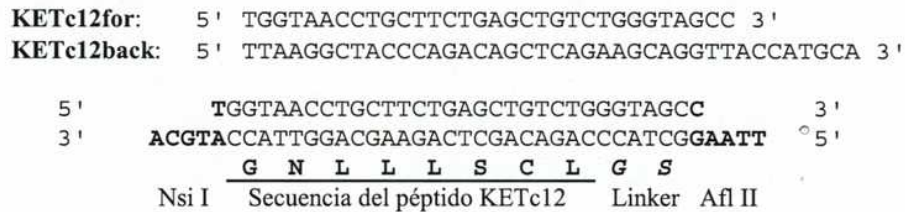
Construcción del gen quimérico

Para la construcción de un gen quimérico, un inserto sintético doble cadena, conteniendo la secuencia del péptido de interés se liga a un vector previamente digerido con las enzimas de restricción Nsi I (New England Biolabs) y Afl II (NEB). El vector utilizado no fue en todos los casos el mismo. Se utilizaron alternativamente pALTER-"LS-2MUT" (descrito en Resultados) o pET11a-"quimera", donde "quimera" representa alguna de las construcciones realizadas (ej: LS-OMP31, LS-KETc1, etc). Todos estos vectores pueden utilizarse por contener los dos sitios de restricción nuevos en su extremo 5'. pALTER-"LS-2MUT" sólo se utilizó en la construcción de la primer quimera, LS-OMP31. Las restantes se obtuvieron utilizando algún pET-"quimera". La única consideración a la hora de elegir el vector de partida fue no utilizar un pET-"quimera" que contuviera un inserto Nsi I-Afl II cuyo extremo 3' fuese similar al del que se deseaba insertar, pues esto ocasiona la detección de falsos positivos en los screenings por colony-PCR.

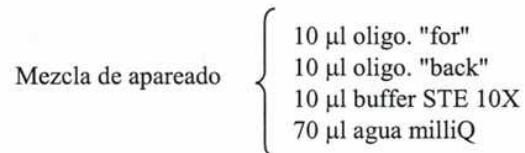
Inserto sintético

Se diseñan dos oligonucleótidos de manera que al aparearse formen un ADN doble cadena conteniendo la secuencia que codifica para el péptido que se desea insertar, flanqueada por los extremos cohesivos propios de las enzimas de restricción Nsi I y Afl

II. A manera de ejemplo se muestran los oligonucleótidos diseñados para la construcción de LS-KETc12 y el inserto sintético formado por estos:



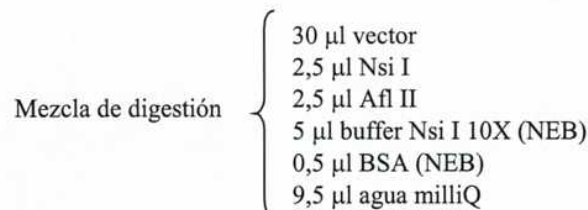
La secuencia "linker" (los aminoácidos glicina y serina) se agregó a la secuencia de los péptidos más cortos. Los oligonucleótidos se obtienen por síntesis química (IDTDNA, fosforilación 5', purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida, escala 250 nanomolar). Los mismos se resuspenden en agua milliQ a una concentración 100 pmol/μl. Se prepara luego la "mezcla de apareado".



La misma se calienta a 100°C y se deja enfriar en baño térmico lentamente (usualmente toda la noche), de manera de maximizar la eficiencia del apareado.

Digestión del vector

Se obtiene masa suficiente del vector a digerir por miniprep. Se prepara la "mezcla de digestión".



La mezcla se incuba a 37°C por dos horas y se siembra en gel de agarosa 0,7% tras lo cual se escinde la banda del vector digerido del gel y se recupera el ADN siguiendo el protocolo GeneClean (Bio 101).

Ligación del inserto sintético al vector digerido

Se prepara la "mezcla de ligación".

Mezcla de ligación	$\left\{ \begin{array}{l} 5 \mu\text{l} \text{ vector digerido} \\ 2,5 \mu\text{l} \text{ inserto sintético} \\ 0,5 \mu\text{l} \text{ ligasa T4 (Promega)} \\ 1 \mu\text{l} \text{ buffer ligasa 10X (Promega)} \\ 2 \mu\text{l} \text{ agua milliQ} \end{array} \right.$
--------------------	--

Se prepara en paralelo una mezcla sin inserto como control negativo de la reacción de ligación. Las mezclas se ubican en baño a temperatura ambiente en recipiente aislante, el cual se deja enfriar lentamente a 4°C.

Screening de la ligación por colony-PCR

Las mezclas de ligación se utilizan para transformar bacterias *E. coli* DH5α o JM109 por el método de shock térmico o de electroporación, alternativamente. Las transformaciones se aplican en cajas de petri de medio LB-agar/Ampicilina y se incuban a 37°C por 16 horas. Un número de colonias se somete a colony-PCR. Para esto, la colonia se suspende en 50 µl de agua y se incuba a 100°C por 10'. Se prepara la "mezcla de PCR".

Mezcla de PCR	$\left\{ \begin{array}{l} 5 \mu\text{l} \text{ suspensión colonia} \\ 1 \mu\text{l} \text{ oligo. "for". (5 pmol/}\mu\text{l)} \\ 2,5 \mu\text{l} \text{ oligo. T7-terminator (2 pmol/}\mu\text{l)} \\ 5 \mu\text{l} \text{ buffer Termopol 10X (NEB)} \\ 5 \mu\text{l} \text{ dNTPs (2,5 mM) (Promega)} \\ 0,5 \mu\text{l} \text{ Taq-polimerasa (Fundación Instituto Leloir)} \\ 31 \mu\text{l} \text{ agua milliQ} \end{array} \right.$
---------------	--

El oligonucleótido "for" a utilizar es el correspondiente al gen quimérico que se está obteniendo. En el caso de LS-KETc12, por ejemplo, se utiliza el oligonucleótido KETc12for, el mismo que sirvió para la obtención del inserto sintético.

La mezcla de PCR se somete al siguiente ciclo térmico:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	} 25 ciclos
94	5	
94	0,5	
60	1	
72	1	
72	10	

Las reacciones de PCR se siembran en gel de agarosa 1,3%. Se identifican como clones positivos aquellos para los que se observa un producto de PCR del tamaño esperado, el cual varía según el largo del oligonucleótido "for" utilizado. Al menos un clon positivo de cada screening se confirma por secuenciación del marco de lectura completo del gen utilizando los primers T7-promoter y T7-terminator.

Expresión y Purificación de proteínas quiméricas

Expresión

El plásmido pET11a conteniendo el gen quimérico se introduce a bacterias *E. coli* BL21(DE3) por transformación por shock térmico, tras lo cual se siembran las bacterias en placa de LB-agar/Ampicilina. Para las pruebas de expresión en escala pequeña, 2 ml de medio LB/Ampicilina se inoculan con una colonia de la placa y se incuba a 37°C con agitación. El cultivo en fase estacionaria se induce con 2 µl de IPTG (1M, IBN). Tres horas más tarde se toman 100 µl de cultivo, se centrifugan y se resuspende el pellet en 25 µl de buffer muestra 1X para su análisis por SDS-PAGE 17% (Laemmli 1970).

Para la expresión con fines preparativos se crece un precultivo de 5 ml hasta fase estacionaria, el cual se utiliza para inocular 500 ml de LB/Ampicilina. El cultivo se incuba con agitación a 37°C y se induce con 0,5 ml de IPTG (1M) al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,8. El cultivo se retira a las tres horas o al día siguiente, alternativamente, y se centrifuga a 4000 g por 20'. El pellet se suspende en 15 ml de solución de suspensión.

$$\text{Solución de suspensión} \left\{ \begin{array}{l} 50 \text{ mM Tris} \\ 5 \text{ mM EDTA} \\ 1\% \text{ Tritón X-100} \\ \text{pH } 8 \end{array} \right.$$

La suspensión se somete a 5' de sonicado neto con intervalos de 1' por cada 1' de sonicado y se centrifuga 30' a 20.000 g. El pellet se resuspende en 15 ml de solución de suspensión sin Tritón X-100 y se repite el sonicado. El proceso se repite luego una tercera vez. Los tres sobrenadantes de sonicado contienen la fracción de la quimera expresada en citoplasma, mientras que el pellet final contiene la fracción de cuerpos de inclusión. Los experimentos incluidos en el presente seminario se realizaron con la proteína obtenida a partir de la fracción de cuerpos de inclusión.

Purificación

Los cuerpos de inclusión se resuspenden en buffer PBS con 8 M urea. La resuspensión se dializa contra PBS dos días con un cambio de buffer. La muestra se centrifuga y el sobrenadante se dializa contra buffer A (50mM Tris/HCl, pH 8,5). El primer paso de purificación se realiza por cromatografía en columna de intercambio aniónico MonoQ o Q-Sepharose (Pharmacia) en equipo de FPLC (Pharmacia). La muestra se inyecta en la columna equilibrada en buffer A y se eluye por gradiente lineal hasta 50% de buffer B (buffer A + 1 M NaCl).

El segundo paso de purificación se realiza por cromatografía en columna de exclusión molecular Superdex 200 (Pharmacia). Para esto el pico de la quimera se concentra en tubo Centriprep (Millipore) e inyecta en la columna de la cual se eluye con PBS. La presencia de la proteína quimérica en los picos se evalúa por SDS-PAGE.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Se procedió de acuerdo al método de LAEMMLI (Laemmli 1970).

Estudios de estructura y estabilidad - Dicroísmo Circular

Las mediciones de dicroísmo circular se realizan en espectropolarímetro J-810 (Jasco), configurado a velocidad de lectura 100 nm/min, tiempo de respuesta 4 s y ancho de banda

1 nm. Se utilizan cubetas de cuarzo de 1, 2 o 5 mm de camino óptico (Hellma). Las muestras se ensayan en buffer fosfato 50 mM pH 7.

El valor de elipticidad molar se calcula según

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{10 \cdot C \cdot \ell}$$

Donde Θ representa el valor medido de elipticidad en mdeg, C es la concentración molar de proteína pentamérica y ℓ es el paso de luz de la cubeta en cm.

Curvas de plegamiento al equilibrio

Las soluciones para cada punto de la curva se preparan a partir de una solución madre de Guanidinio-HCl 6 M (ICN, ultra pure), fosfato 50 mM, pH 7. La concentración final de proteína es de 0,2 μ M de pentámero, es decir 1 μ M de monómero. Las muestras se incuban tres horas a temperatura ambiente y se centrifugan antes de la medición. Las mediciones se realizan en cubeta de 5 mm, a 25°C.

Curvas de desplegamiento por temperatura (Tm)

La temperatura de la cubeta se controla por sistema Peltier (Jasco). La muestra se calienta 4°C por minuto desde 25°C a 95°C mientras se registra el valor de dicroísmo circular a 220 nm cada 0,1°C.

Ajustes de las curvas

El ajuste no lineal de las curvas de plegamiento al equilibrio y de desnaturalización térmica se realiza con el programa “Micromath Scientist 2.01”.

Estudios inmunológicos

Ensayo de ELISA

Se utilizaron placas de alto pegado de poliestireno (Maxisorp, NUNC, Dinamarca). Todas las incubaciones se realizaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los volúmenes utilizados fueron de 50 μ l, excepto el bloqueo que se realizó con 200 μ l. Como

bloqueante y diluyente de sueros y conjugados se empleó leche descremada en polvo al 1% (cuando se usó una proteína como antígeno) o 3% (cuando se usaron bacterias enteras como antígeno) en PBS. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con PBS.

La placa se sensibilizó con 0,1 µg de proteína recombinante purificada (LS-WT u OMP31) o 50 µl de una suspensión de $DO_{600} = 0,5$ de bacterias enteras inactivadas (producidas por el laboratorio del Dr. Raúl Bowden). OMP31 es expresada en forma recombinante en bacterias *E. coli* en el laboratorio del Dr. Carlos A. Fossati. La proteína se purifica en buffer con guanidinio 2M.

Los ensayos se incubaron con anticuerpos anti inmunoglobulinas totales de ratón o conejo (según corresponda) conjugados con HRP y se revelaron con con 2 µg/µl de ortho-phenilendiamina y 0.03% H_2O_2 en 0.1 M de buffer fosfato citrato. La reacción se detuvo con 50 µl de H_2SO_4 4N. El color desarrollado se leyó a 492 nm en un lector de microplacas. Los títulos de anticuerpos se calcularon como la última dilución que resultó ser mayor que el valor del suero negativo.

Inmunización de ratones

Las inyecciones de antígeno se realizaron por la vía intraperitoneal.

Grupo “AF”

1era dosis, día 0: 25 µg LS-OMP31 en 150 µl PBS + 150 µl AFC¹.

2da dosis, día 20: 25 µg LS-OMP31 en 150 µl PBS + 150 µl AFI².

3ra dosis, día 40: ídem 2da dosis.

Grupo “PBS”

1era dosis, día 0: 25 µg LS-OMP31 en 250 µl PBS.

2da dosis, día 20: ídem 1era dosis.

3ra dosis, día 40: ídem 1era dosis.

¹ AFC = Adyuvante Completo de Freund

² AFI = Adyuvante Incompleto de Freund

Se extrajeron muestras de sangre a los 7 días de la 3ra dosis. Se centrifugaron las muestras y se conservó congelado el sobrenadante (antisuero).

Inmunización de conejo

Se aplicó el siguiente cronograma de inmunización:

1era dosis, día 0: 200 µg LS-OMP31 en 1 ml PBS + 1ml AFC. Inyección intramuscular.

2da dosis, día 22: 200 µg LS-OMP31 en 1 ml PBS + 1ml AFI Inyección subcutánea.

3ra dosis, día 45: 200 µg LS-OMP31 en 1 ml PBS + 1ml AFI. Inyección intramuscular.

4ta dosis, día 155: 200 µg LS-OMP31 en 1 ml PBS + 1ml AFI. Inyección subcutánea.

Se extrajeron muestras de sangre a los días 31, 52 y 180. Se centrifugaron las muestras y se conservó congelado el sobrenadante (antisuero).

RESULTADOS

Creación de genes quiméricos

Estrategia

Para la creación de los genes que codifican para las proteínas quiméricas se optó por desarrollar un sistema tipo “cassette” que permitiera el fácil reemplazo del extremo 5' del gen de la lumazina sintetasa (LS), el cual codifica para su extremo N-terminal. Esto permitió disponer de un sistema simple para la creación de las distintas quimeras de interés. La estrategia seguida se resume en la figura 1.

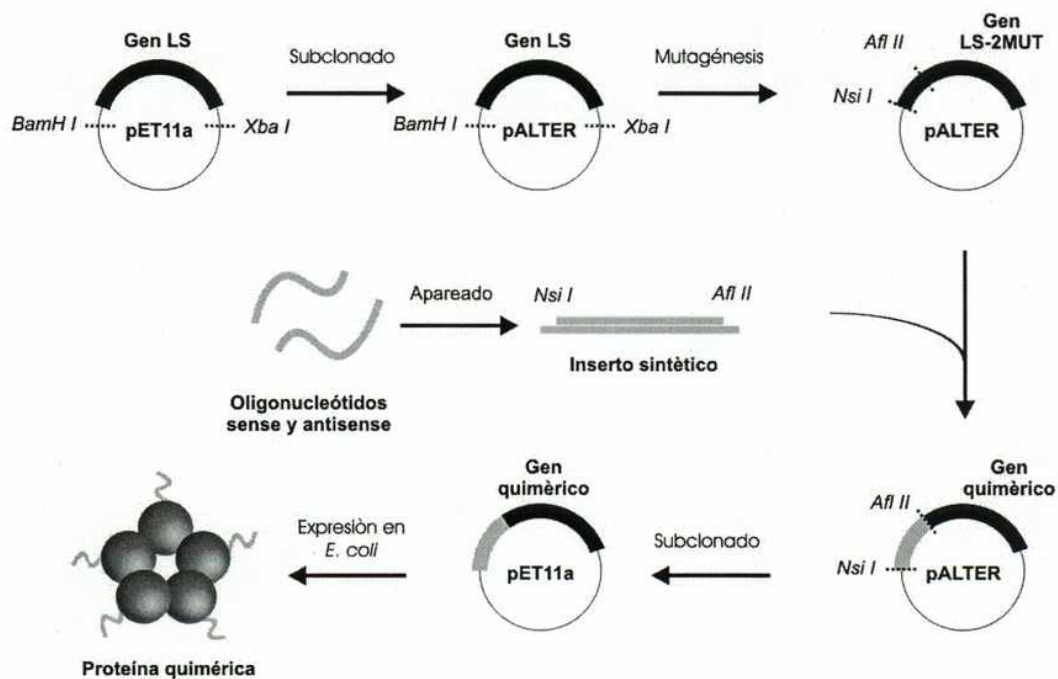


Figura 7. Estrategia para la producción de proteínas quiméricas. (Ver texto)

Desarrollo del cassette

Para el desarrollo del cassette se insertaron en la región 5' del gen de la LS dos sitios de restricción nuevos, Nsi I y Afl II (Fig. 2). Estos sitios nuevos permitirán luego el reemplazo del extremo 5' del gen.

LS-WT: GGA GAT ATA CAT **ATG GCT AGC AAC CAA AGC TGT CCG AAC AAG ACA TCC**
M A S N Q S C P N K T S

LS-2MUT: GGA GAT ATA CAT **ATG CAT** AGC AAC CAA AGC TGT CCG **CTT AAG** ACA TCC
H L
Nsi I Afl II

Figura 8. Detalle del extremo 5' del gen de la LS-WT y LS doble mutante ("LS-2MUT"). Negritas: región codificante (se muestra la secuencia de aminoácidos en código de una letra); subrayado: bases mutadas en el cassette; recuadrado: nuevos sitios de restricción.

Para la incorporación de estos sitios se siguió el protocolo de mutagénesis sitio dirigida Altered Sites II (Promega)³ (Fig 3).

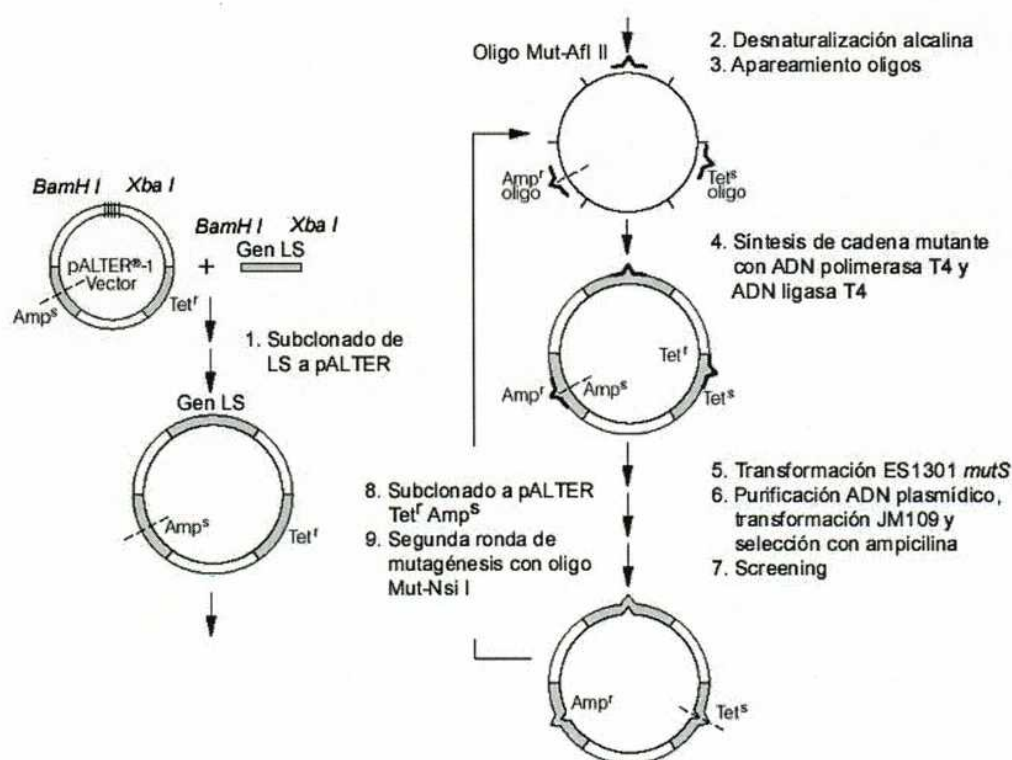


Figura 9. Protocolo seguido para la obtención de LS-2MUT. 1. El gen de la LS se subclonó desde el vector de expresión pET11a (Stratagene) al vector pALTER-Ex1 (Promega). Se realizó el subclonado utilizando las enzimas

³ <http://www.promega.com/tbs/tm001/tm001.html>

Mut-Nsi I: 5' AT ATA **CAT** ATG GCT AGC AAC C 3'

Mut-Afl II: 5' AA AGC TGT CCG **CTT** AAG ACA TCC TTT A 3'

Mut-Nsi I Mut-Afl II

Vector (no codificante) Gen LS (extremo 5')

El resultado de la mutagénesis se verificó por ensayos de restricción con las enzimas Nsi I y Afl II y por secuenciación automática utilizando el oligonucleótido "T7 promoter" (Novagen) como primer (Fig. 5).

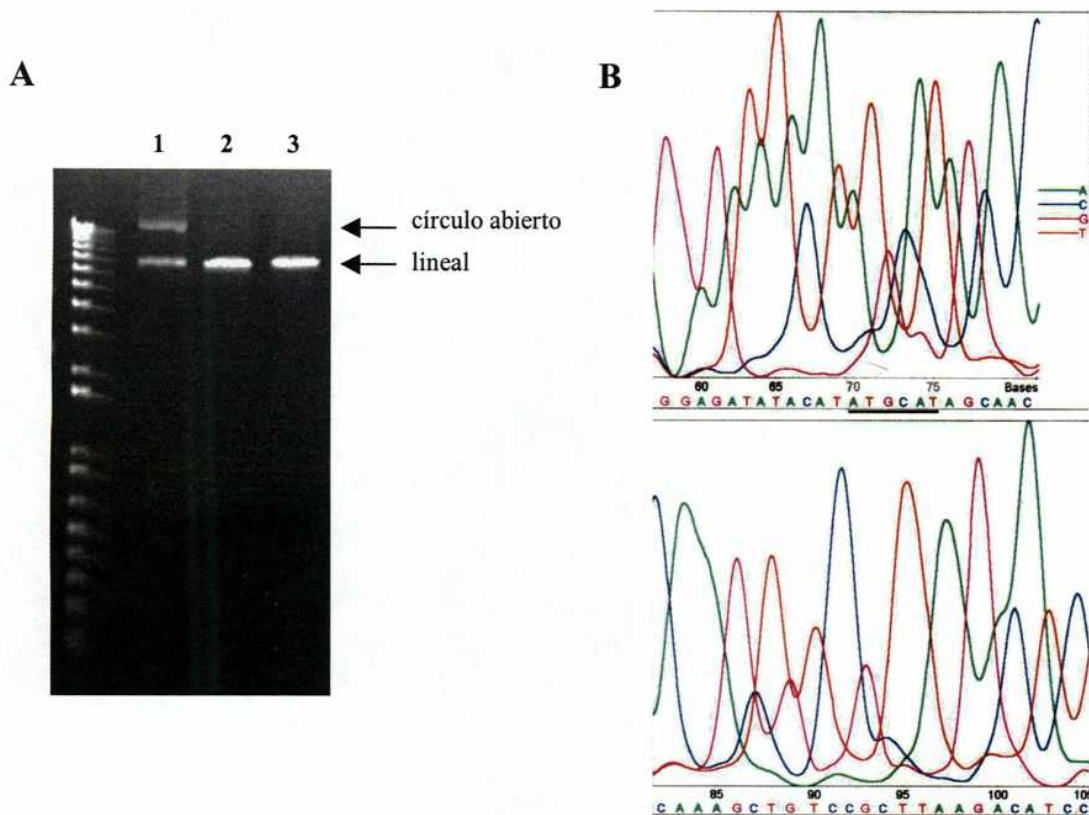


Figura 11. A: Ensayo de restricción. 1: pALTER-LS-2MUT sin digerir. 2: pALTER-LS-2MUT digerido con Afl II. 3: Cassete digerido con Nsi I. Ambos tratamientos linealizaron el vector, indicando que el mismo incorporó los sitios de restricción para ambas enzimas. **B:** Cromatograma correspondiente a la secuenciación del cassette. Se subrayan en negro las secuencias de los nuevos sitios de restricción.

Al elegir los sitios a insertar (Nsi I y Afl II) se consideró que no existieran ya en el gen de la LS ni en los vectores pET11a y pALTER-Ex1. Nsi I tiene un sitio de corte en el sitio de clonado múltiple de pALTER-Ex1, pero éste fue removido en el subclonado, al digerir previamente el vector con Xba I y BamH I.

Obtención de los genes quiméricos

La construcción de genes quiméricos se realizó según se describe en **Métodos**. Se obtuvieron de esta manera ocho genes quiméricos, los cuales se detallan en la tabla 1. El

primero de ellos, LS-OMP31, se obtuvo ligando el inserto sintético correspondiente sobre LS-2MUT en pALTER-Ex1. El gen de LS-OMP31 se subclonó a pET11a para su expresión. Tanto la inserción como el posterior subclonado fueron confirmados por secuenciación del marco de lectura. Los restantes genes quiméricos se obtuvieron ligando los insertos sintéticos directamente a una digestión Nsi I-Afl II del vector pET11a-LS-OMP31, el cual por poseer los sitios para estas enzimas puede funcionar como aceptor de insertos. Se evitó así el paso de subclonado desde pALTER a pET para las quimeras subsiguientes. A su vez, como se describe a continuación, se puso a punto un protocolo de *screening* por *colony-PCR*, que permite identificar rápidamente clones positivos tras los ensayos de construcción de genes quiméricos. Todas las construcciones se confirman finalmente por secuenciación del marco de lectura completo del gen.

Se ensayó la factibilidad de un *screening* por *colony-PCR* que no requiriese la síntesis de nuevos oligonucleótidos específicos para cada quimera. Se ensayó en primer lugar la posibilidad de usar las combinaciones de primers T7-promoter / OMP31Back y T7-terminator / OMP31for para detectar la presencia del inserto en el gen LS-OMP31. T7-promoter y T7-terminator son primers de secuenciación universales (Novagen), con sitios de reconocimiento específicos río arriba y río abajo respectivamente del gen clonado en pET11a (ver mapa en Métodos). Las combinaciones de primers mencionadas resultarían en productos de tamaños esperados de 181 pb y 640 pb respectivamente. Se ensayaron reacciones de PCR según el protocolo descrito en Métodos, utilizando pET11a-LS-OMP31 como templado. Sólo T7-terminator / OMP31for resultó en un producto del tamaño esperado (Fig. 6A, calle d). La identidad de este producto se confirmó por secuenciación. En la figura 6B se muestra un ejemplo de un *screening* exitoso por *colony-PCR*. Usualmente el 80% de las colonias ensayadas resultaron positivas para la inserción buscada. Para cada gen quimérico sintetizado se secuenció al menos uno de los clones positivos. Una vez confirmada la obtención del gen de interés, se obtuvo ADN plasmídico por el método de la lisis alcalina (miniprep) y se transformó bacterias *E. coli* BI21(DE3), en las que se llevaría a cabo la expresión de las proteínas quiméricas.

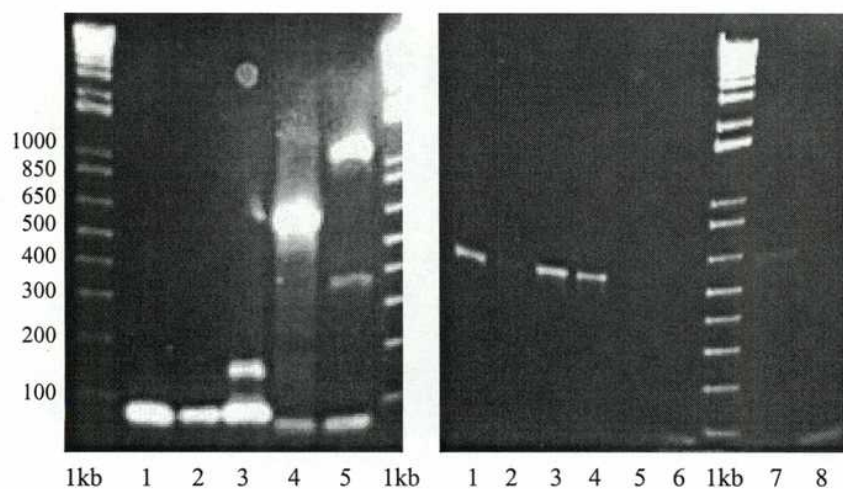


Figura 12. Ensayos de colony PCR. **A.** Ensayo preliminar. Se realizaron PCRs utilizando pET11a-LS-OMP31 como templado y los primers T7-promoter/OMP31Back (1 y 2), sólo T7-promoter como control negativo (3), T7-terminator/OMP31for (4) y sólo T7-terminator como control negativo (5). Se sembraron 15 µl de la reacción en 1, 3, 4 y 5 y 5 µl en 2. **B.** Screening de LS-KETc1. Calles 1 a 6: colony-PCRs. 7: control positivo. 8: control negativo. 1 a 5 resultaron positivos para la inserción.

Se obtuvieron ocho genes quiméricos, cuya secuencia se detalla en la Tabla 1.

LS-OMP31	Long. = 27 aa	MW = 19777,5	pI = 6,00
5' TAACGCCGGTTACGCAGCGCGCAAGTTCAAGCATCCATTTTCTAGCTTTGACAAGGAAGACAACGAACAGGTTTCCGGTTCGC 3' ACGTATTGCGGCCAATGCGTCCGCCGTTCAAGTTCGTAGGTAAAGATCGAAACTGTTCTTCTGTTGCTTGTCCAAAGGCCAAGCGAATT N A G Y A G G K F K H P F S S F D K E D N E Q V S G S			
LS-KETc12	Long. = 10 aa	MW = 17849,5	pI = 5,52
5' TGGTAACCTGCTTCTGAGCTGTCTGGGTAGCC 3' 3' ACGTACCATTGGACGAAGACTCGACAGACCCATCGGAATT 5' G N L L L S C L G S			
LS-KETc1	Long. = 14 aa	MW = 18221,9	pI = 9,79
5' TGCCCCGATGAGCACGCCGAGCGCCACGAGCGTCCGCGGTAGCC 3' 3' ACGTACGGGGCTACTCGTGGGCTCGCGGTGCTCGCAGGCGCCATCGGAATT 5' A P M S T P S A T S V R G S			
LS-GK1	Long. = 21 aa	MW = 19232,9	pI = 5,06
5' TGGTTATTATTATCCGAGCGACCCGAACAGTTCTATGCCCCGCGTATAGCCAGGCCAGCGCCC 3' 3' ACGTACCAATAATAATAGGCTCGCTGGGCTTGTGCAAGATACGGGGCGGCATATCGGTCCGGTCGCGGGAATT 5' G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y S Q A S A			
LS-MEAM	Long. = 10 aa	MW = 18017,7	pI = 11,17
5' TAACATCATCCGTACCAAAAAACAGGGTAGCC 3' 3' ACGTATTGTAGTAGGCATGGTTTTTTGTCCCATCGGAATT 5' N I I R T K K Q G S			
LS-MEAL	Long. = 13 aa	MW = 18337,0	pI = 5,19
5' TATCAACCAGGATCCGGATAAAATCCTGACCTACGGTAGCC 3' 3' ACGTATAGTTGGTCCTAGGCCTATTTTAGGACTGGATGCCATCGGAATT 5' I N Q D P D K I L T Y G S			
LS-RSVM	Long. = 10 aa	MW = 17999,6	pI = 8,54
5' TCACTGGTCTATCTCTAAACCGCAGGGTAGCC 3' 3' ACGTAGTGACCAGATAGAGATTGGCGTCCCATCGGAATT 5' H W S I S K P Q G S			
LS-TRP2	Long. = 10 aa	MW = 18105,5	pI = 5,06
5' TGTCTATGACTTCTTCGTCTGGCTGGGTAGCC 3' 3' ACGTACAGATACTGAAGAAGCAGACCGACCCATCGGAATT 5' V Y D F F V W L G S			

Tabla 1. Genes quiméricos obtenidos. Se detalla para cada uno la secuencia de los oligonucleótidos utilizados y la secuencia aminoacídica para la que codifican. Se indica también la longitud del péptido insertado, su punto isoeléctrico teórico y el peso molecular teórico del monómero de proteína resultante.

Expresión y purificación de las proteínas quiméricas

De los ocho genes quiméricos sintetizados, seis de las proteínas quiméricas pudieron ser exitosamente expresadas y purificadas.

Ensayos de expresión en escala pequeña

Antes de crecer cultivos bacterianos con fines preparativos, se realizaron ensayos de expresión de los genes quiméricos obtenidos como se describe en Métodos. Un número de clones de bacterias transformadas se ensayan de manera de trabajar luego con aquel de mayor nivel de producción de proteína recombinante. En la figura 7 se muestra el ensayo para LS-OMP31, tras el cual se decidió trabajar con el clon de la calle 2.

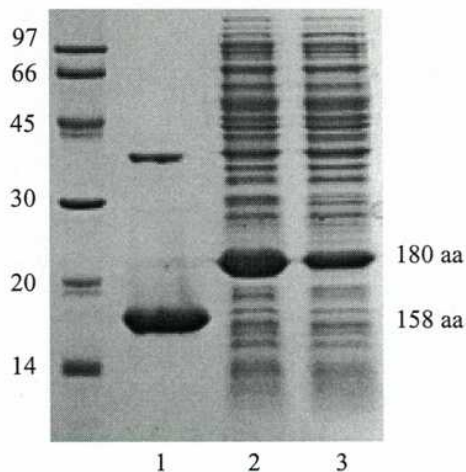


Figura 13. Ensayo de expresión de LS-OMP31. SDS-PAGE 17%. **1.** LS-WT purificada. **2 y 3.** Alícuotas de cultivo de expresión de dos clones de LS-OMP31. Por tratarse de un gel desnaturizante, la proteína migra como un monómero por encima del marcador de 20 KDa.

La figura 8 muestra la expresión en escala pequeña de la proteína WT y seis quimeras. Se observa que el nivel de expresión de la proteína no se ve afectado sensiblemente por el reemplazo de su extremo N-terminal en las proteínas quiméricas.

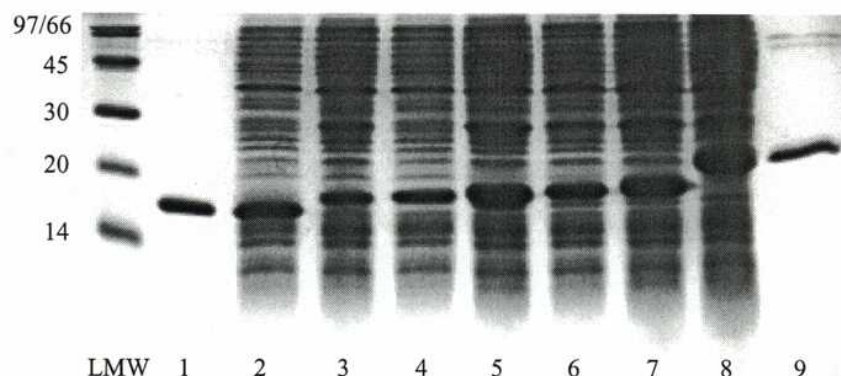
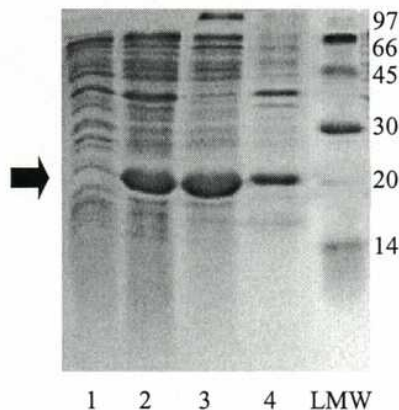


Figura 14. Ensayos de expresión en escala pequeña. SDS-PAGE 17%. **1.** LS-WT purificada. **2.** LS-WT. **3.** LS-KETc12. **4.** LS-MEAM. **5.** LS-RSVM. **6.** LS-MEAL. **7.** LS-KETc1. **8.** LS-OMP31. **9.** LS-OMP31 purificada.

Expresión, Replegado y Purificación de LS-OMP31

La expresión, replegado y purificación de LS-OMP31 se realizó siguiendo, en líneas generales, los procedimientos descritos para LS-WT⁴ (Goldbaum 1999), los cuales se detallan en Métodos. El cultivo bacteriano de expresión se lisó, dando origen a dos fracciones, la de periplasma/citoplasma y la de cuerpos de inclusión (Fig. 9).



⁴ Cabe destacar que el reemplazo del extremo N-terminal simplifica y reduce el costo de la purificación. Dado que se elimina la cisteína presente en la LS-WT, se hace posible trabajar sin el agregado de DTT en la purificación de aquellas quimeras que no incorporen una cisteína en la secuencia del péptido insertado.

Figura 15. Expresión de LS-OMP31. SDS-PAGE 17%. **1.** Cultivo sin inducir. **2.** Cultivo inducido con 1mM IPTG. **3.** Fracción citoplasmática. **4.** Fracción de cuerpos de inclusión resuspendidos en 8M urea. La flecha señala las bandas correspondientes a LS-OMP31. (LMW = marcadores de peso molecular; se indica su peso en kilodaltons).

Se observa que no existen niveles apreciables de expresión de LS-OMP31 previo a la inducción del cultivo. Tras la inducción se observa una fuerte sobreexpresión de la misma. La proteína se encuentra tanto en fracción citoplasmática como en cuerpos de inclusión, aunque en distintas cantidades. Los cuerpos de inclusión resuspendidos en buffer con urea 8M se sometieron al protocolo de replegado descrito en Métodos.

La fracción de cuerpos de inclusión replegados se purificó por cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q-Sepharose (Fig. 10) seguida de cromatografía en columna de exclusión molecular Superdex 200 (Fig. 11), como se describe en Métodos. La composición de los picos se analizó por SDS-PAGE (Fig. 12).

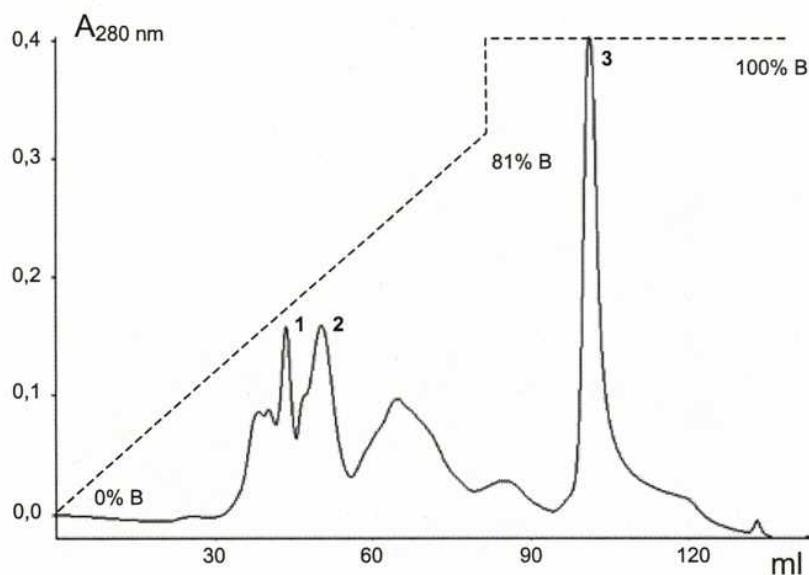


Figura 16. Cromatograma correspondiente a la elución por gradiente de LS-OMP31 de columna de Q-Sepharose. La línea de puntos representa el gradiente de 0 a 81% de buffer B seguido por el salto a 100% de B. Se numeran los picos analizados luego por gel.

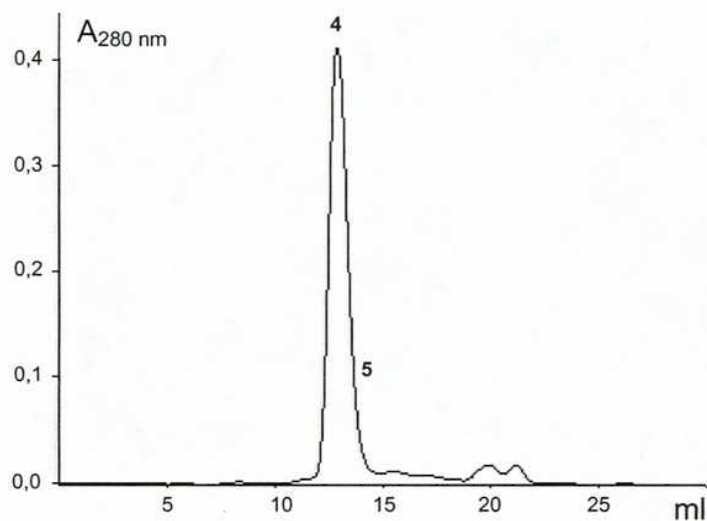


Figura 17. Cromatograma correspondiente a la elución de LS-OMP31 de columna Superdex 200. Se numeran los picos analizados luego por gel.

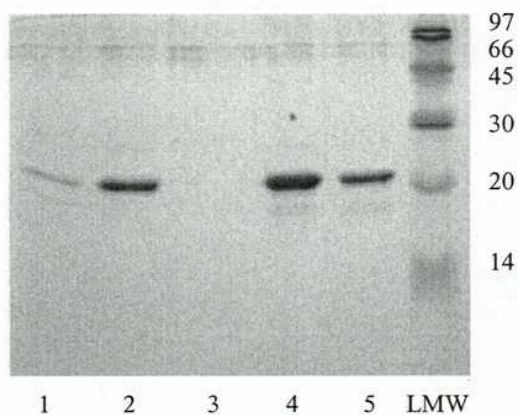


Figura 18. Purificación de LS-OMP31 seguida por SDS-PAGE 17%. Los números de calle se corresponden con la numeración de los picos en las figuras 16 y 17. (LMW = marcadores de peso molecular; se indica su peso en kilodaltons).

LS-OMP31 eluyó de la columna de intercambio aniónico como un pico a 50,2% de buffer B (Fig. 10, pico 2; Fig. 12, calle 2). Este se concentró por Centriprep (Millipore) y se inyectó en columna de exclusión molecular, de donde eluyó como un pico a 12,85 ml de buffer (Fig. 11, pico 4+5; Fig. 12, calles 4 y 5).

El mismo protocolo de purificación se aplicó a la purificación de las restantes proteínas quiméricas. Se purificaron con éxito LS-KETc12, LS-MEAM, LS-RSVM, LS-MEAL y LS-KETc1. LS-TRP2 pudo purificarse pero la proteína no pudo mantenerse en solución en las condiciones ensayadas. LS-GK1 no pudo ser purificada. El rendimiento de las purificaciones fue del orden de los 20 mg de proteína por litro de cultivo.

Estructura y estabilidad de las proteínas quiméricas

Estructura

La primera evidencia de que la proteína quimérica LS-OMP31 adopta un plegamiento pentamérico se obtuvo a partir del volumen de elución de la misma de la columna de exclusión molecular (Fig. 13).

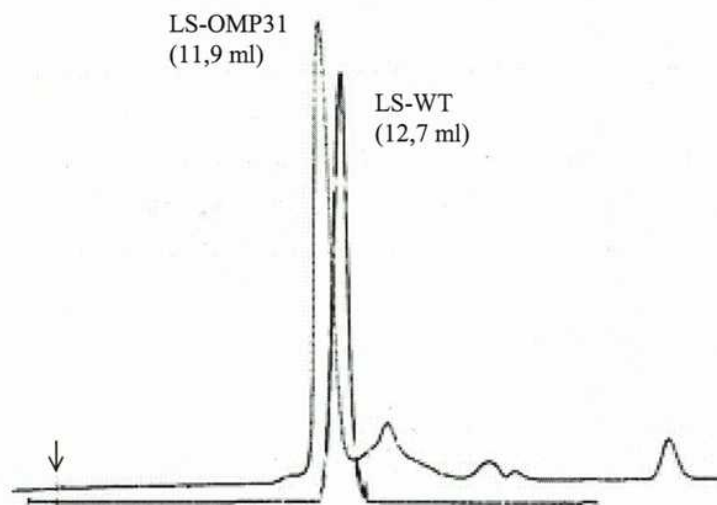


Figura 19. Cromatogramas correspondientes a la elución de LS-WT y LS-OMP31 de la columna Superdex 200. La flecha marca la inyección de las muestras. Se indica entre paréntesis el volumen de elución de cada proteína.

De acuerdo a una calibración de la columna, 12,7 ml se corresponde a un peso molecular de 75 KDa y 11,9 a 93 KDa. Los pesos moleculares teóricos de los pentámeros de LS-WT y LS-OMP31 son de 87,2 y 98,9 KDa respectivamente. Aunque la exactitud de la

calibración es baja, el resultado indicaría que la quimera eluye como pentámero de la columna.

Todas las quimeras purificadas eluyeron de acuerdo al volumen de elución esperado para un pentámero en la cromatografía de exclusión molecular.

La estructura secundaria de las quimeras se evaluó por dicroísmo circular (CD) (Fig. 14). La LS presenta un espectro de CD en el ultravioleta lejano coherente con su alto contenido de hélices alfa. El espectro de elipticidad molar de la quimera LS-OMP31 superpone casi con exactitud con el obtenido para LS-WT, confirmando que la misma no presenta cambios importantes en sus estructuras secundarias debido a la inserción del péptido foráneo en su extremo amino.

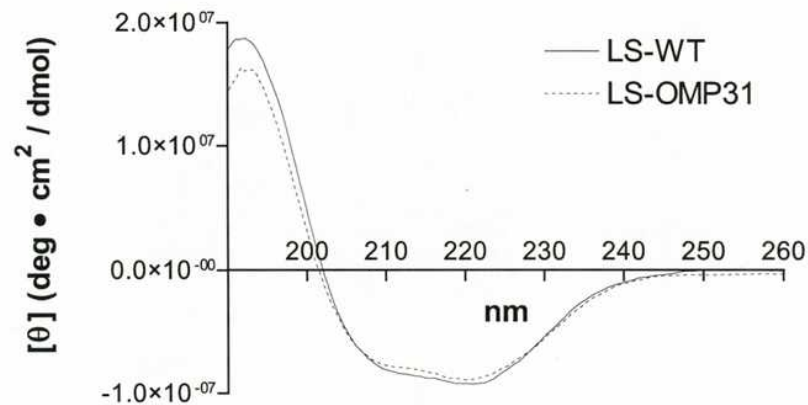


Figura 20. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (260 a 190 nm) de LS-WT y LS-OMP31 expresado en unidades de elipticidad molar.

Todas las quimeras purificadas mostraron espectros similares de dicroísmo circular.

Estabilidad

Una vez confirmado que las proteínas quiméricas desarrolladas se plegaban correctamente en forma de pentámeros, de estructura secundaria comparable a la de la proteína WT, se estudió si las sustituciones del extremo N-terminal comprometían de alguna manera a la estabilidad de las proteínas. Para esto se estudió la desnaturalización de las quimeras por hidrocloreuro de guanidinio (Gdm-HCl) y por temperatura.

La desnaturalización de las proteínas se siguió por el valor de CD a 220 nm. La figura 15 muestra los espectros de CD de LS-OMP31 en 0 y 5,5 M del agente desnaturalizante guanidinio. Se observa que el valor de CD a 220 nm resulta extremadamente sensible al desplegamiento de la proteína.

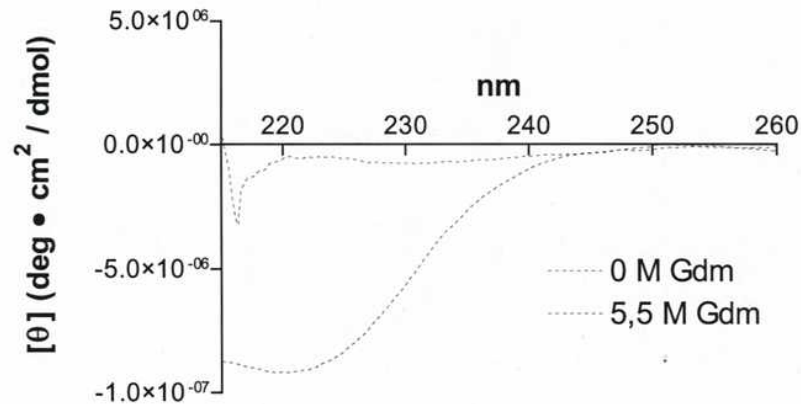


Figura 21. Espectros de CD de LS-OMP31 nativa (0 M Guanidinio) y desnaturalizada (5,5 M Guanidinio).

Curvas de desnaturalización al equilibrio

A partir de las curvas de desnaturalización al equilibrio es posible estimar la estabilidad conformacional propia de una proteína (Pace 1986). Para esto, se incuban muestras de proteína purificada con concentraciones crecientes de un agente desnaturalizante hasta que la reacción de plegamiento/desplegamiento alcance el equilibrio, tras lo cual se cuantifica la proporción de proteína plegada a cada concentración. Se realizaron curvas de desnaturalización por guanidinio para las quimeras purificadas, como se describe en Métodos (Fig. 16).

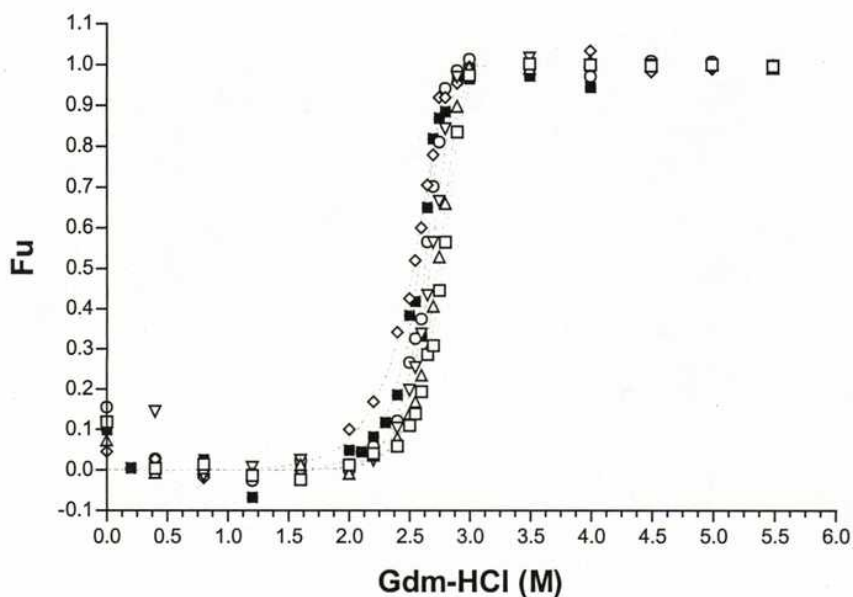


Figura 22. Curvas de desnaturalización al equilibrio por hidrocloreuro de guanidinio. Se graficó la fracción no plegada (F_u) en función de la concentración de guanidinio. Cuadrados negros: LS-WT, símbolos blancos: quimeras. El cálculo de F_u , así como el ajuste de las curvas se describe en el texto.

Análisis termodinámico de las curvas de desnaturalización

Para determinar el cambio de energía libre asociado al desplegamiento de cada proteína, los datos experimentales deben ajustarse a una curva teórica que describa la dependencia de la constante de equilibrio entre el estado plegado y el desplegado con la concentración de agente desnaturalizante.

Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la desnaturalización de la LS por hidrocloreuro de guanidinio es una reacción de dos estados, según la cual la pérdida de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína están acopladas en una única transición cooperativa:



Son evidencia de esto: 1) En columna de exclusión molecular en buffer guanidinio 6M, la LS eluye con un volumen correspondiente a su peso molecular monomérico. 2) En las

curvas de desnaturalización al equilibrio se observa una única transición cooperativa, lo cual sería coherente con que no existan concentraciones apreciables de estados intermediarios en la reacción. 3) Las curvas medidas por dicroísmo circular o fluorescencia coinciden. Siendo el CD en el UV lejano una medida de estructura secundaria y la fluorescencia una de estructura terciaria, este resultado sugiere que la pérdida de estos dos niveles de estructura esta acoplada. 4) La desnaturalización por guanidinio es reversible en las condiciones utilizadas, obteniendose valores de reversibilidad de entre 60 y 100%, tanto para LS-WT como para LS-OMP31 y LS-KETc1 (datos no mostrados).

A partir de estos resultados, las curvas de desnaturalización al equilibrio se ajustaron a un modelo de dos estados, según el cual el pentámero realiza una transición en un paso a cinco monómeros desplegados. Las fórmulas que describen esta transición se dedujeron a partir de las ya desarrolladas para proteínas monoméricas (Pace 1986) y dimericas (Mok 1996), como se describe a continuación.

La constante de equilibrio de la reacción (1) se calcula como

$$K_U = \frac{[U]^5}{[N]}. \quad (2)$$

La energía libre de desplegamiento (ΔG_U) se relaciona con la constante de equilibrio según

$$K_U = e^{\left(\frac{-\Delta G_U}{R \cdot T}\right)} \quad (3)$$

La energía libre de desplegamiento puede considerarse linealmente dependiente de la concentración de guanidinio ($[Gdm]$) (Pace 1986):

$$\Delta G_U = \Delta G_{H_2O} - m \cdot [Gdm]. \quad (4)$$

Donde ΔG_{H_2O} representa a la energía libre de desplegamiento en ausencia de agente desnaturalizante, y constituye un parámetro termodinámico característico de cada proteína. El parámetro m constituye la pendiente de cooperatividad.

Siendo la concentración total de monómero (P_t)

$$P_T = 5 [N_5] + [U] , \quad (5)$$

la fracción de proteína plegada (F_N) y de proteína desplegada (F_U) pueden expresarse como:

$$F_N = \frac{5 [N_5]}{P_t} \quad (6)$$

$$F_U = 1 - F_N = \frac{[U]}{P_T} \quad (7)$$

La constante de equilibrio expresada en función de F_U resulta entonces

$$K_U = \frac{F_U^5}{1 - F_U} 5 P_t^4 \quad (8)$$

El valor de F_U se obtiene para cada punto de la curva experimental como

$$F_U = \frac{(m_f [Gdm] + F) - Y}{(m_f [Gdm] + F) - (m_u [Gdm] + U)} \quad (9)$$

donde Y corresponde al valor de elipticidad leído, $[Gdm]$ es la concentración de guanidinio y los parametros restantes corresponden a las rectas que describen las regiones de la curva antes y despues de la transición cooperativa de desplegamiento y se muestran en la figura 17.

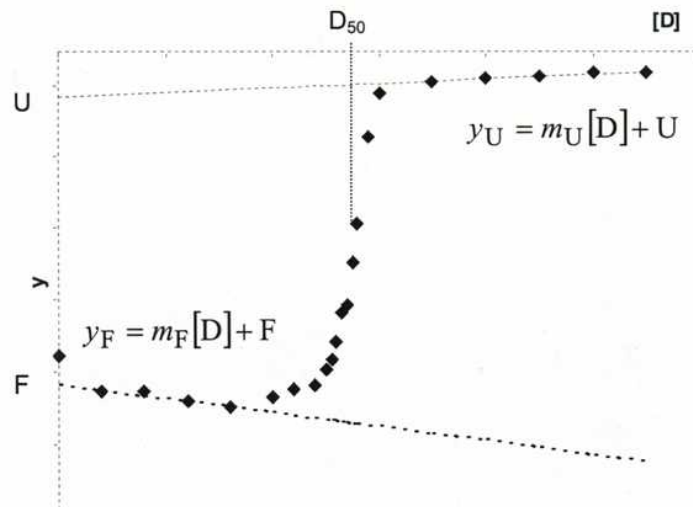


Figura 23. Parámetros en una curva de desnaturalización al equilibrio. Se muestran las rectas que describen las líneas de base del estado plegado ($y_F = m_F [D] + F$) y del desplegado ($y_D = m_D [D] + F$) así como la concentración de desnaturalizante para la cual la proteína se despliega en un 50% (D_{50}).

De la combinación de las ecuaciones 3, 4, 8 y 9 se obtiene la ecuación que permite ajustar las curvas experimentales y deducir el valor de los parámetros termodinámicos:

$$5 \left[\frac{(m_f / Gdm) + F - Y}{(m_f / Gdm) + F - (m_u / Gdm) + U} \right]^5 Pt^4 + \left[\frac{(m_f / Gdm) + F - Y}{(m_f / Gdm) + F - (m_u / Gdm) + U} - 1 \right] e^{\frac{\Delta G_{H2O} - m / Gdm}{RT}} = 0$$

Los resultados obtenidos por el ajuste de las curvas mostradas en la figura 16 se detallan en la tabla 2.

Proteína	ΔG_{H2O} (Kjoule/mol)	m (Kjoule/K * mol)	D_{50} (M)
LS-WT	305 ± 30	64 ± 11	2,6
LS-KETc12	335 ± 9	73 ± 3	2,7
LS-RSVM	343 ± 18	77 ± 7	2,6
LS-MEAL	258 ± 14	47 ± 5	2,5
LS-KETc1	340 ± 10	73 ± 3	2,7
LS-OMP31	342 ± 15	73 ± 5	2,8

Tabla 2. Parámetros de las curvas de desnaturalización por guanidinio de las proteínas quiméricas y la LS-WT. Los errores corresponden al desvío estándar de cada parámetro en el ajuste no lineal.

El valor de D_{50} corresponde a la concentración de desnaturalizante (guanidinio) para la cual la proteína se desnaturaliza en un 50% y se calcula según la siguiente fórmula:

$$D_{50} = \frac{RT \ln \left(Pt^4 \frac{5}{16} \right) + \Delta G_{H2O}}{m},$$

la cual se deduce de las ecuaciones anteriores.

Se observa que, a excepción de LS-MEAL⁵, las quimeras ensayadas no ven modificada su energía libre de desplegamiento ni su pendiente de cooperatividad respecto a la LS-WT.

Desnaturalización térmica

La lumazina sintetasa es desnaturalizada a altas temperaturas de manera irreversible. Dada la irreversibilidad del proceso, no es posible calcular a partir del mismo parámetros termodinámicos propios del desplegamiento de la proteína. Se puede sin embargo tomar el parámetro empírico “ T_m aparente” (temperatura de desnaturalización media, T_m) como indicador de estabilidad térmica. La figura 18 muestra una curva de desnaturalización térmica de la LS. Se observa que la proteína realiza una transición cooperativa de desnaturalización centrada aproximadamente en los 87°C.

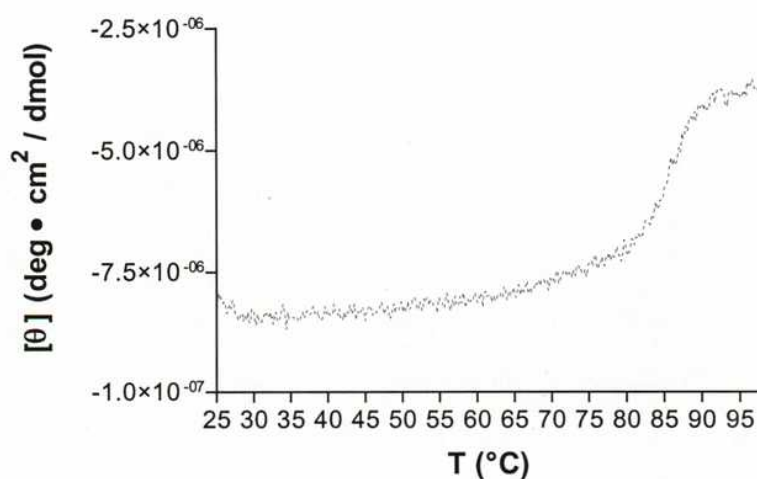


Figura 24. Desnaturalización térmica de LS-WT. Se grafica la elipticidad molar a 220 nm en función de la temperatura para una concentración de proteína de 0,2 μM .

⁵ En la figura 22 LS-MEAL está representada por rombos blancos.

Se realizaron curvas de desnaturalización térmica para las proteínas quiméricas. Para calcular el valor de T_m de cada curva, las mismas se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$y = \frac{(k_{F1} \cdot e^{(k_{F2} \cdot T)} + F) + (m_U \cdot T + U) \cdot e^{m \cdot (T - T_m)}}{1 + e^{m \cdot (T - T_m)}}$$

donde y representa el valor de CD_{220nm} , F , k_{F1} y k_{F2} son parámetros de la exponencial que describe el cambio con la temperatura del valor de CD_{220nm} para la proteína plegada, U y m_u son parámetros de la recta que describe a la proteína desplegada y m y T_m describen la pendiente y el punto medio de la transición cooperativa entre los dos estados respectivamente.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 3.

Proteína	T_m (°C)
LS-WT	$86,3 \pm 0,1$
LS-KETc12	$87,7 \pm 0,1$
LS-MEAM	$88,8 \pm 0,4$
LS-RSVM	$88,3 \pm 0,1$
LS-MEAL	$88,6 \pm 0,1$
LS-KETc1	$88,1 \pm 0,1$
LS-OMP31	$86,5 \pm 0,1$
LS-TRP2	$87,5 \pm 0,1$

Tabla 3. Temperatura de desnaturalización media aparente para las quimeras y LS-WT. El error corresponde al desvío estándar del parámetro T_m en el ajuste no lineal.

Se observa que no existe una pérdida de estabilidad térmica en las proteínas quiméricas ensayadas.

Antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas quiméricas

Antigenicidad

Se define como antigenicidad a la capacidad de una sustancia de unirse al sitio de unión a antígenos de un anticuerpo específico (Janeway). Se estudio la antigenicidad de LS-

OMP31. Se estudio su capacidad de unir a un anticuerpo monoclonal específico contra el péptido insertado (A59/10F09/G10, (Bowden 1995)) y a uno específico contra la proteína LS-WT (BI24, (Goldbaum 1992)). Esto permitió ensayar tanto la antigenicidad del péptido como del núcleo de la proteína. La antigenicidad se ensayó por ELISA, como se detalla en **Métodos #** (Fig. 19).

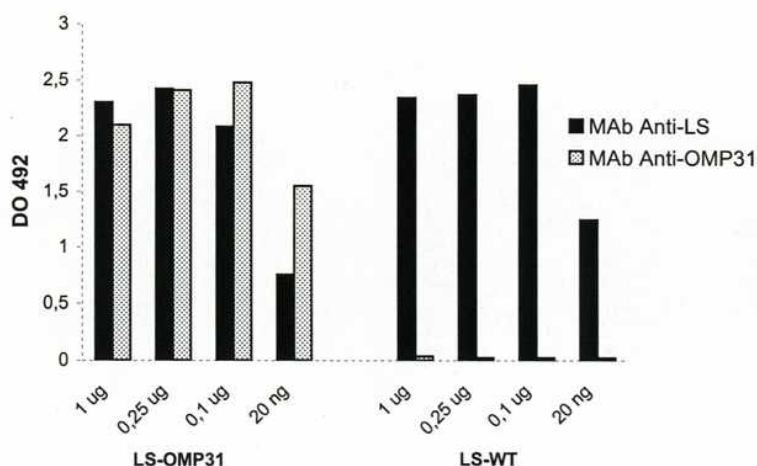


Figura 25. Antigenicidad de LS-OMP31 por ELISA. Se utilizaron masas de 1 ug, 0,25 ug, 0,1 ug y 20 ng de LS-OMP31 y LS-WT como antígenos y Mab Anti-LS (1/1000) y Mab Anti-OMP31 (1/1000) como anticuerpos.

Se observa que LS-OMP31 es reconocida tanto por el anticuerpo monoclonal que reconoce LS-WT como por el que reconoce el péptido insertado, mientras que LS-WT sólo es reconocida por el primer anticuerpo. Esto indica que el péptido conserva sus propiedades antigénicas al ser presentado por la quimera. A su vez, el plegamiento de la quimera no presenta cambios importantes que impidan su reconocimiento por el anticuerpo anti-LS. Ambos anticuerpos detectaron hasta 20 ng de quimera por pocillo.

Inmunogenicidad

Se define como inmunogenicidad a la capacidad de una sustancia de generar una respuesta inmune humoral o celular específica. La inmunogenicidad de LS-OMP31 se estudió en ratones y conejo.

Inmunización de ratones

Se evaluó la capacidad de LS-OMP31 de generar respuesta inmune humoral específica contra el péptido insertado al ser inyectada con y sin adyuvante en ratones. Se trabajó con dos grupos de cinco ratones cada uno, como se describe en **Métodos**. El grupo "AF" recibió tres dosis intraperitoneales de 25 ug de proteína en emulsión al medio con adyuvante de Freund a los 0, 20 y 40 días. La primer dosis se aplicó en adyuvante completo y las restantes en incompleto. El grupo "PBS" recibió el mismo tratamiento pero con la proteína inyectada sin adyuvante. Se extrajo sangre a los 7 días de la tercera inmunización y se ensayó la reactividad de los sueros contra la proteína de membrana OMP31 por ELISA (Fig. 20).

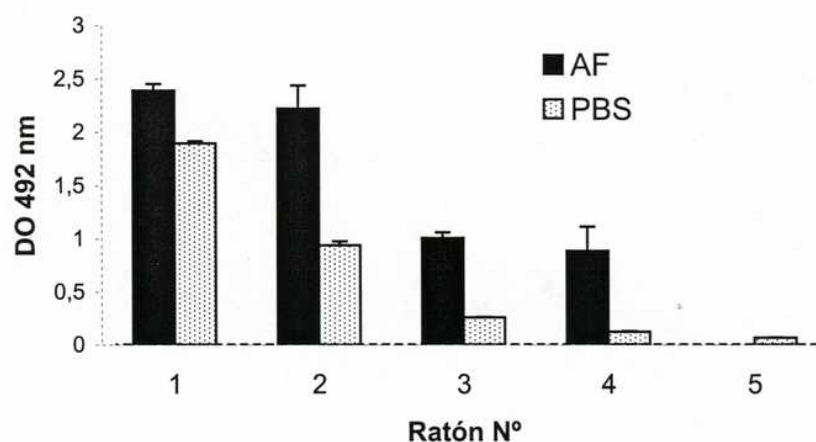


Figura 26. Inmunogenecidad de LS-OMP31 por ELISA. Reactividad de diluciones 1/100 de sueros de ratones inmunizados con LS-OMP31 con adyuvante ("AF", 4 ratones) o sin adyuvante ("PBS", 5 ratones) contra OMP31. Los sueros de cada grupo se ordenaron por reactividad decreciente. Se indica con línea de puntos la reactividad de un suero pre-inmune (control negativo). Un ratón del grupo AF murió antes de la extracción.

Se obtuvo una fuerte respuesta contra OMP31 en ratones inmunizados con la quimera en adyuvante ⁶. Resulta muy interesante la alta respuesta obtenida en el grupo PBS. Uno de los sueros de este grupo resultó incluso de reactividad mayor que algunos de AF. Esto demuestra que ratones inmunizados con la quimera LS-OMP31 con y sin adyuvante desarrollan una respuesta inmune específica contra el péptido insertado.

Inmunización de conejo

Un conejo se inyectó con LS-OMP31 en adyuvante siguiendo el protocolo descrito en Métodos. Los antisueros colectados luego de la 2da, 3ra y 4ta dosis de antígeno se titularon por ELISA contra la proteína de membrana OMP31 recombinante (Fig. 21).

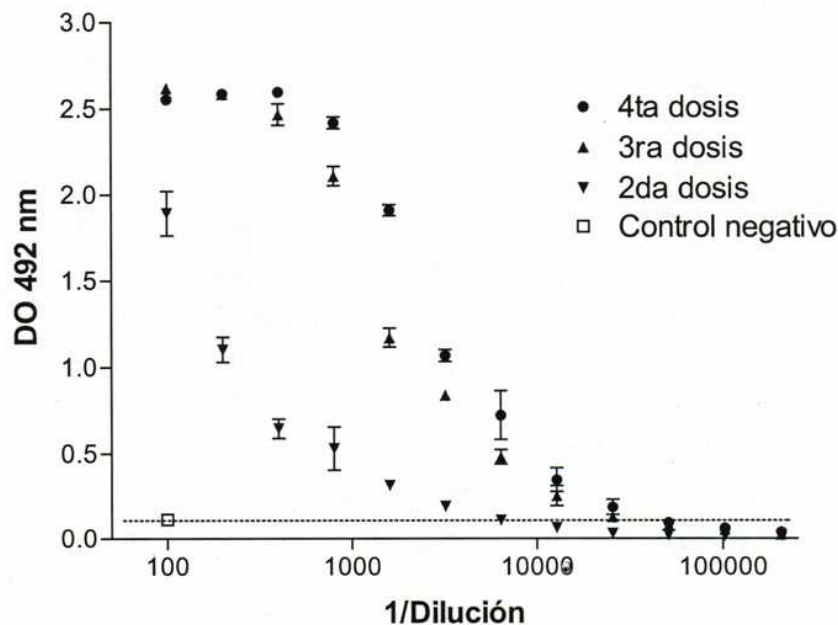


Figura 27. ELISA de titulación de sueros de conejo anti LS-OMP31. Se ensayó la reactividad de los tres sueros contra OMP31. Se utilizó como suero negativo una dilución 1/100 de un suero de conejo anti LS-WT. Se ilustra en línea de puntos la reactividad de este suero.

⁶ Se determinó que los sueros de los dos ratones de mayor reactividad del grupo AF reconocen específicamente a OMP31 hasta una dilución de 1/10.000 (datos no mostrados).

El título de los antisueros ensayados, definido como la máxima dilución en reconocer el antígeno por sobre el suero negativo, fue de 3200, 12800 y 25600 para los sueros correspondientes a la 2da, 3ra y 4ta dosis respectivamente. El conejo inmunizado desarrolló una fuerte respuesta inmune específica contra OMP31. Dado que el suero contra LS-WT no reconoce a OMP31 (figura 21, control negativo), esta alta reactividad se debe a una respuesta de anticuerpos específicos contra el péptido insertado en la quimera.

La proteína OMP31 utilizada en los ensayos de ELISA mostrados se produce en forma recombinante en *E. coli*, de donde se purifica. Por tratarse de una proteína integral de membrana, la misma no puede mantenerse en solución acuosa, por lo que se obtiene en condiciones desnaturizantes. En los ensayos mostrados, entonces, no se demuestra que los antisueros sean capaces de reconocer a OMP31 en su conformación nativa en el contexto de la membrana externa bacteriana. Esta propiedad sería importante para la potencial efectividad de la quimera como inmunógeno capaz de conferir inmunidad humoral contra *Brucella*. Para evaluar esta posibilidad se realizaron ensayos de ELISA utilizando como antígeno dos cepas de *B. melitensis* H38, una lisa y otra rugosa (Fig. 22).

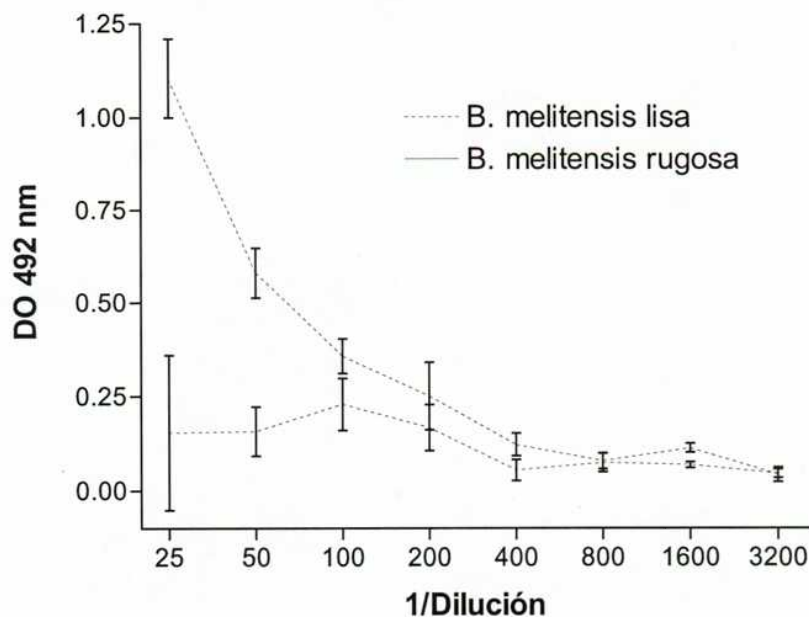


Figura 28. Reactividad del suero de conejo anti LS-OMP31 (4ta dosis) contra bacteria entera *B. melitensis* H38 lisa o rugosa. A los valores mostrados se restó la reactividad correspondiente a un suero de conejo anti LS-WT, el cual se tituló en simultáneo contra ambos antígenos. Los errores corresponden a la suma de errores estandar de la media.

La reactividad de un suero contra bacterias enteras resulta por lo general difícil de evaluar debido a la complejidad del antígeno utilizado. El ensayo demuestra sin embargo que el suero anti LS-OMP31 reconoce específicamente a OMP31 insertada en la membrana de la cepa rugosa. La reactividad de este suero contra la cepa lisa no se diferencia de la propia del suero anti LS-WT. Este resultado es totalmente coherente con el publicado para el anticuerpo monoclonal A59/10F09/G10 (Bowden 1995). Este anticuerpo específico para el epítipo insertado en la quimera LS-OMP31 reconoce fuertemente a la cepa rugosa de *B. melitensis* H38 y no así a la cepa lisa, lo cual obedecería a la mayor exposición de la proteína de membrana en la primer cepa. Se comprobó entonces que el péptido presentado en el contexto de la LS es capaz de inducir anticuerpos que reconocen a OMP31 en su estructura nativa.

Quimeras mixtas

Se ensayó la posibilidad de obtener “quimeras mixtas”, esto es, pentámeros conteniendo monómeros de distintas quimeras. Estos pentámeros podrían presentar entonces una mezcla de hasta cinco péptidos antigénicos distintos, actuando así como inmunógenos polivalentes. Para intentar obtener estas quimeras mixtas se aprovechó la reversibilidad de la desnaturalización de LS por guanidinio. Se buscó obtener quimeras mixtas entre LS-OMP31 y LS-KETc1, siguiendo la estrategia que se describe en la figura 23.

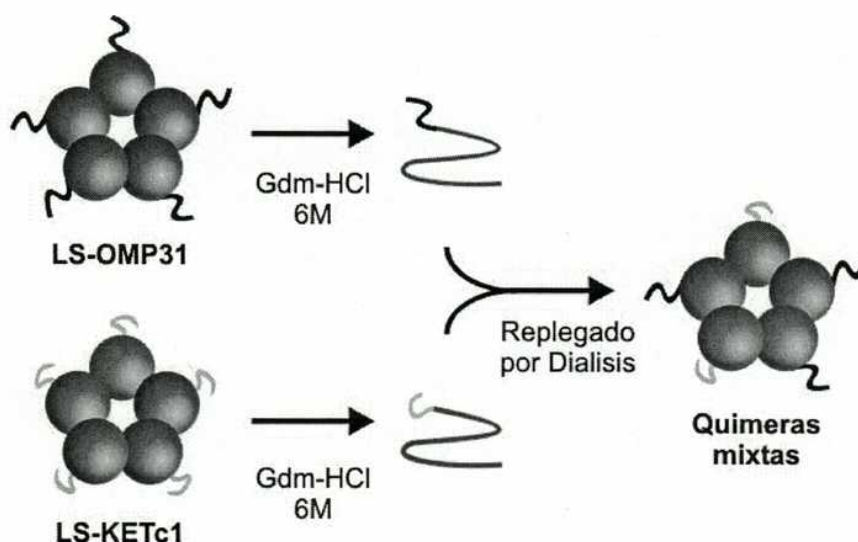


Figura 29. Estrategia seguida para la obtención de quimeras mixtas. Las proteínas se despliegan en guanidinio 6M, se mezclan y se repliegan por diálisis.

La diferencia de peso molecular entre las quimeras mixtas de distinta composición de monómeros no sería suficiente para discriminarlas. Es por esto que se eligió trabajar con LS-OMP31 y LS-KETc1, quimeras con péptidos de punto isoeléctrico (pI) sensiblemente distinto (ver Tabla 1). De esta manera, los pentámeros formados por distintas proporciones de monómeros de estas quimeras tendrían carga neta de superficie y pI distinto, posibilitando su separación por isoelectroenfoque o cromatografía de intercambio iónico.

Una mezcla de LS-OMP31 y LS-KETc1 (300 μ M cada una) se desnaturizó por agregado de guanidinio hasta concentración final 6 M. Esta mezcla se replegó por diálisis prolongada contra buffer PBS, PMSF 1mM, EDTA 1mM. La muestra se centrifugó y se conservó el sobrenadante (llamamos a esta muestra “quimeras mixtas”). El mismo procedimiento se realizó en paralelo para LS-OMP31 y LS-KETc1 por separado (300 μ M cada una) como controles. El rendimiento de replegamiento de las muestras se estimó por dicroísmo circular a 220 nm, obteniendo valores del orden del 20%.

Las muestras obtenidas se sembraron en columna de exclusión molecular (Fig. 24).

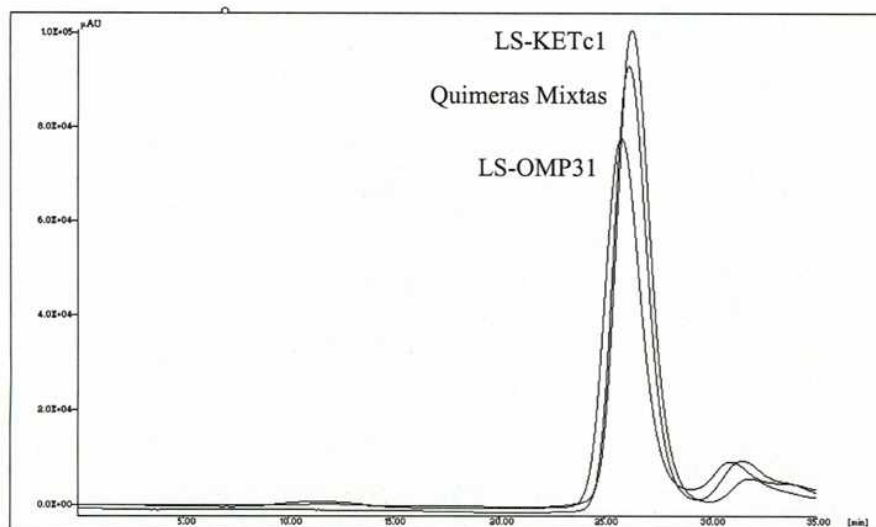


Figura 30. Cromatogramas de Superdex 200. Se superpusieron las corridas de LS-OMP31 replegada, LS-KETc1 replegada y la muestra de quimeras mixtas.

LS-OMP31 y LS-KETc1 replegados eluyeron con volumen de elución 12,65 y 13,16 ml respectivamente, siendo estos volúmenes los esperados para los pentámeros plegados. LS-OMP31, siendo la de mayor peso molecular eluye a un menor volumen que LS-KETc1. La muestra de quimeras mixtas eluyó como lo haría un pentámero plegado de peso molecular intermedio, a un volumen de 13,08 ml. Como se había anticipado, la baja sensibilidad del método no permite discriminar pentámeros de distinto peso molecular dentro de la muestra de quimeras mixtas.

Para analizar la composición de las muestras obtenidas, una alícuota se concentró en CentriCon y se sembró en gel de isoelectroenfoque (Fig. 24) (PhastGel IEF 5-8, PhastSystem, Pharmacia). La corrida se realizó según las instrucciones del fabricante y se reveló con Coomassie Blue.

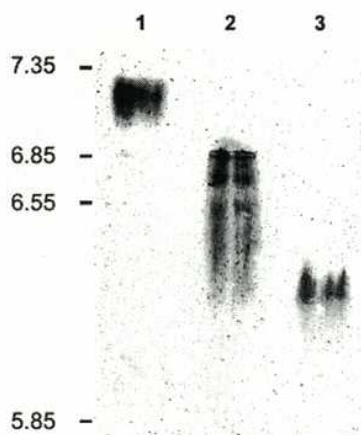


Figura 31. Isoelectroenfoque de quimeras mixtas. **Calle 1:** LS-KETc1 replegada (control). **Calle 2:** Quimeras mixtas. **Calle 3:** LS-OMP31 replegada (control). Se indica la posición de marcadores de pI.

LS-KETc1 corre con un pI de 7,20 (Fig. 24, calle 1) y LS-OMP31 de 6,35 (Fig 24., calle 3). La muestra de quimeras mixtas presenta bandas correspondientes a pI intermedios, de entre 6,85 y 6,35, demostrando la formación de una variedad de proteínas de distintos puntos isoeléctricos.

Para confirmar la formación de quimeras mixtas y caracterizar su composición, las muestras purificadas por Superdex 200 se analizaron por columna de intercambio aniónico MonoQ (Pharmacia). La figura 26 muestra los cromatogramas correspondientes a las tres cromatografías y un SDS-PAGE en el que se sembraron muestras de los distintos picos obtenidos.

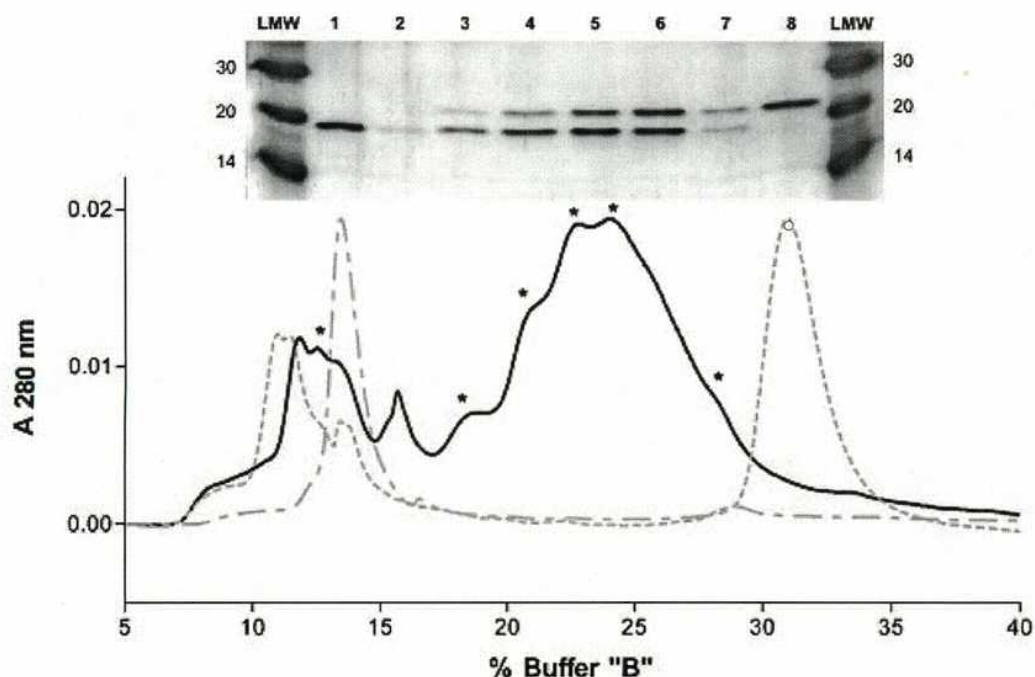


Figura 32. Cromatogramas de MonoQ. Línea negra: quimeras mixtas. Línea gris de raya-punto-raya: LS-KETc1. Línea gris de puntos: LS-OMP31. Las corridas de LS-OMP31 y LS-KETc1 se escalaron verticalmente de manera que su altura máxima coincida con la de las quimeras mixtas. Sobre los cromatogramas se ubica un SDS-PAGE 17% en el cual se analizaron los picos obtenidos. Calle 1: pico mayoritario LS-KETc1. Calle 8: pico mayoritario LS-OMP31. Calles 2 a 7: picos intermedios en la corrida de quimeras mixtas (los seis picos sembrados se indican con asteriscos sobre el cromatograma).

Se observa que la muestra de quimeras mixtas contiene proteínas de comportamiento cromatográfico intermedio entre los propios de las dos quimeras puras. Tratándose de una columna de intercambio iónico, esto significa que las proteínas poseen una densidad de carga de superficie intermedia. El SDS-PAGE confirma que estas proteínas están compuestas exclusivamente de monómeros de LS-KETc1 y LS-OMP31 y permite observar la proporción de monómeros en cada pico de la corrida. Se observa como la proporción de monómero de LS-OMP31 aumenta desde la calle 2 a la 7. El gel se analizó por densitometría y se comparó para cada calle (de la 2 a la 7) la intensidad de las bandas de los monómeros. El porcentaje de monómero de LS-OMP31 fue de 0, 17, 17,

37, 47 y 60% en las calles 2 a 7. Los picos mayoritarios corresponderían entonces a pentámeros mixtos con 3 monómeros de una quimera y 2 de la otra.

De los resultados mostrados se deduce entonces que la muestra “quimeras mixtas” contiene proteínas pentaméricas, compuestas exclusivamente por monómeros de LS-OMP31 y LS-KETc1 cuyos puntos isoeléctricos y cargas de superficie son intermedios a los característicos de ambas quimeras. Estos resultados confirman que se obtuvieron con éxito pentámeros constituidos por mezclas de monómeros distintos. La confirmación definitiva de este resultado provendrá de estudios de espectroscopía de masa.

Podemos preguntarnos si la manera en que se formaron los pentámeros mixtos fue aleatoria. Es decir, si la proporción de los distintos pentámeros formados obedeció puramente a las leyes del azar. Si este fuera el caso, la probabilidad de que se forme un pentámero con x monómeros de LS-OMP31 (y entonces con $5-x$ monómeros de LS-KETc1, claro) sigue una distribución binomial con $n = 5$ y $p = 1/2$. Según esta distribución, las proporciones esperadas de pentámeros serían:

Monómeros de LS-KETc1	Monómeros de LS-OMP31	Proporción esperada
0	5	1 / 32
1	4	5 / 32
2	3	10 / 32
3	2	10 / 32
4	1	5 / 32
5	0	1 / 32

Esto explica la forma del cromatograma obtenido, en el que son mayoritarios los picos con cantidades similares de cada monómeros (Fig 26, 22% a 27% de buffer B y calles 5 y 6). Se deduce entonces que los pentámeros mixtos se formaron al azar a partir de monómeros desplegados. Este resultado corrobora asimismo el modelo propuesto para el desplegamiento de la LS, según el cual la misma es desnaturalizada por el guanidinio a sus monómeros desplegados disociados.

Proyecciones del trabajo

Diversas aplicaciones de las quimeras producidas están siendo ensayadas en colaboración con distintos grupos de investigación. A continuación se presentan los resultados preliminares obtenidos hasta el momento, precedidos de una breve introducción a cada modelo experimental.

Brucelosis (LS-OMP31)

El péptido insertado a la quimera LS-OMP31 corresponde a la secuencia de un bucle expuesto de la proteína integral de membrana externa de *Brucella melitensis*, Outer Membrane Protein 31 (OMP31). Este bucle de la proteína constituye una región inmunodominante de la misma (Vizcaino 1996). El anticuerpo monoclonal A58/10F09/G10, el cual reconoce a la secuencia insertada, confiere inmunidad pasiva contra la infección experimental con *Brucella ovis* a ratones (Bowden 1995). El epítipo en cuestión sólo sería accesible a anticuerpos en las cepas rugosas de *Brucella spp.* (Bowden 1995) (esta propiedad se comprobó también en la presente tesis). Como se mencionó en la introducción, la lumazina sintetasa se encuentra en todas las especies de *Brucella* conocidas. OMP31, en tanto, se encuentra en todas menos en *B. abortus*, aunque con algunas variaciones de secuencia concentradas en sus bucles (Vizcaino 2001). La quimera LS-OMP31 se estudia entonces como una posible herramienta en el diagnóstico y la vacunación contra *Brucella* rugosas, en particular *B. ovis* en ovinos.

En trabajos realizados por el laboratorio del Dr. Carlos A. Fossati (IDEHU-UBA-CONICET), LS-OMP31 fue subclonada al vector de expresión eucariota pCI-NEO (Promega) de manera de evaluar la respuesta inmune humoral y celular y la protección inducidas por la quimera como vacuna de ADN. Como se mencionó en la introducción, una vacuna de ADN codificando para la LS-WT protegió parcialmente a ratones contra la infección experimental con *B. abortus* (Velikovsky 2002).

La expresión de LS-OMP31 se comparó con la de OMP31 entera clonada en el mismo vector de expresión eucariota en células COS transfectadas (Figura 27).

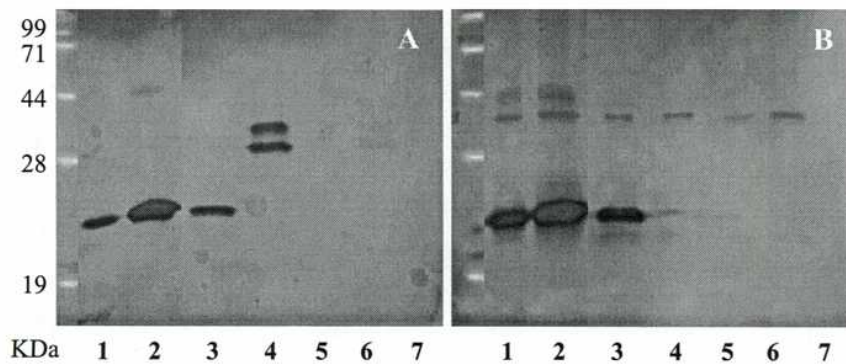


Figura 33. Expresión de LS-OMP31 y OMP31 en células COS-7 analizado por Western-blot con anticuerpos monoclonales específicos contra el bucle inmunodominante de OMP31 (A) o contra LS-WT (B). 1 y 2: Lisado de células transfectadas con pCI-LSOMP31 a las 24 y 48 hs de cultivo respectivamente. 3: Sobrenadante de células transfectadas con pCI-LSOMP31 a las 48hs de cultivo. 4: Lisado de células transfectadas con pCI-OMP31 a las 48 hs de cultivo. 5: Sobrenadante de células transfectadas con pCI-OMP31 a las 48hs de cultivo. 6: Lisado de células COS-7 sin transfectar. 7: Sobrenadante de células COS-7 sin transfectar. Se indica el peso de los marcadores en KDa.

Se observa expresión de LS-OMP31 a las 24 y 48 hs de cultivo (calles 1 y 2). Se observó expresión de OMP31 a las 48 hs de cultivo (calle A-4) y no así a las 24 hs (no mostrado en la figura). El resultado más interesante es la detección de la quimera y no así de OMP31 en el sobrenadante de cultivo (calles A-3 y A-5). Dado que los niveles de transcripción de ambos genes fueron similares en un ensayo por RT-PCR (no mostrado), las diferencias en los niveles de expresión podrían deberse a la mayor estabilidad de LS-OMP31 respecto a OMP31.

La capacidad de LS-OMP31 de proteger ratones contra la infección experimental con *Brucella ovis* fue ensayada por el laboratorio del Dr. Raúl Bowden (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro) (Fig. 28).

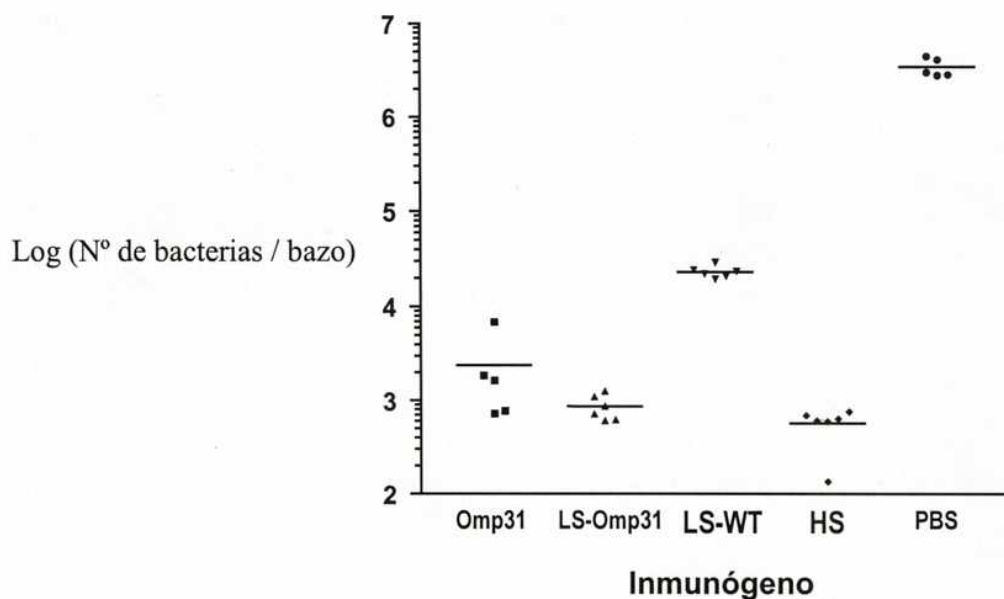


Figura 34. Protección contra *B. ovis*. Se inmunizaron ratones con OMP31, LS-OMP31, LS-WT, extracto salino de *Brucella* (“HS”, control positivo) o vehículo (“PBS”, control negativo). Los animales fueron infectados posteriormente con una alta dosis de *B. ovis*. Se grafica el número de bacterias recuperadas de bazo de animales infectados para cada grupo en escala logarítmica.

Los ratones control, los cuales recibieron emulsión de PBS en adyuvante incompleto de Freund resultaron alta y uniformemente infectados (6,5 logaritmos). Los ratones inmunizados con OMP31 recombinante resultaron eficientemente protegidos. LS-WT resultó asimismo protectora pero a menor nivel. La quimera LS-OMP31, por su parte, brindó una mayor protección que LS-WT. Mas aún, el nivel de protección conferido no resultó significativamente distinto al del control positivo, un extracto bacteriano crudo. Estos resultados muestran que el agregado del epítipo mayoritario de OMP31 al extremo N-terminal de la LS mejora significativamente su capacidad protectora y la convierte en un inmunógeno potencialmente útil para el desarrollo de una vacuna acelular contra *B. ovis*.

Sarampión (LS-MEAL y LS-MEAM) y Virus Respiratorio Sincicial (LS-RSVM)

El virus del sarampión (Measles) es un miembro de la familia de los paramyxovirus. Aún cuando el uso generalizado de una vacuna atenuada ha sido exitoso en países desarrollados, el virus sigue siendo una de las principales causas de mortalidad infantil en muchas partes del mundo. El desarrollo de vacunas acelulares puede plantearse como una estrategia válida para el control del sarampión. El virus respiratorio sincicial (Respiratory Syncytial Virus, “RSV”) es la principal causa de bronquitis y neumonía en niños en el mundo contra el cual no existe actualmente una vacuna efectiva y segura. Se está estudiando actualmente el potencial rol protector de péptidos capaces de mimetizar estructuralmente a proteínas de superficie de ambos virus (mimotopes), habiéndose obtenido resultados positivos en modelos murinos (Hsu 1998; Olszewska 2000). Los estudios inmunológicos de las quimeras desarrolladas son realizados por el grupo de trabajo dirigido por Michael W. Steward en The Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido.

La figura 29 muestra los resultados de un ensayo comparativo en el que se inmunizaron ratones con LS-MEAM o con un péptido soluble que incluye la secuencia insertada en esta quimera.

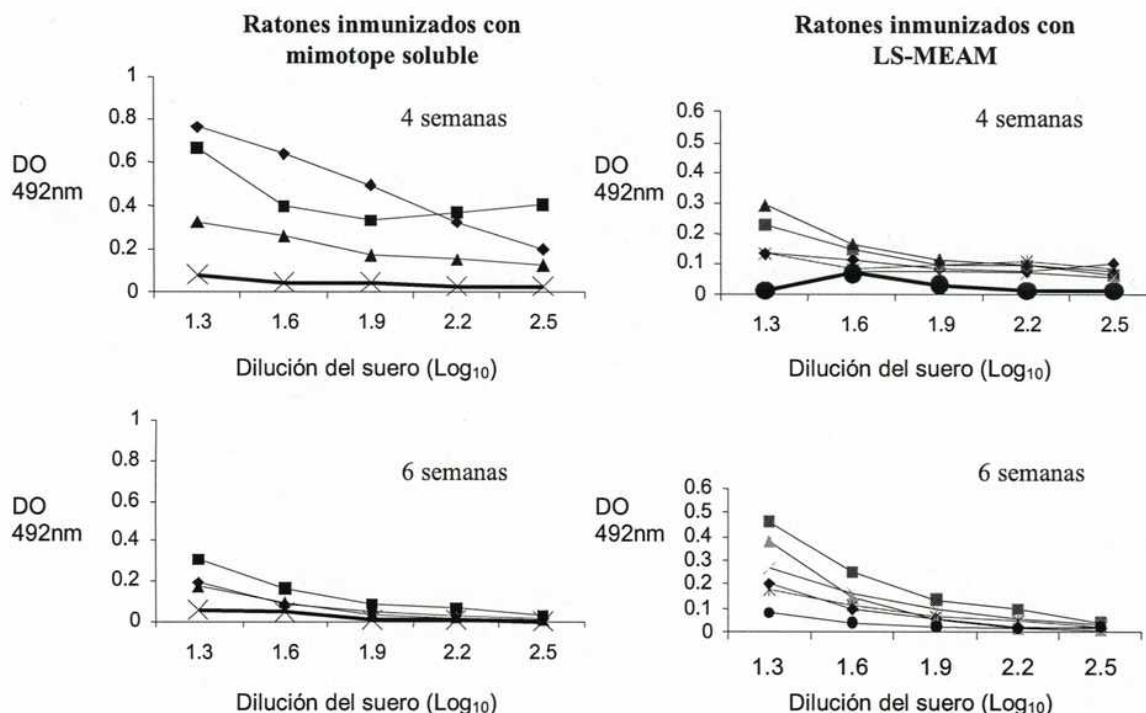


Figura 35. Respuesta humoral de ratones inmunizados con LS-MEAM o con un péptido soluble conteniendo al mimotopo ensayada por ELISA contra el mimotopo. Se muestra la titulación de sueros extraídos a las 4 y 6 semanas del primer refuerzo con antígeno en adyuvande de Freund. La línea de menor DO en cada grafico corresponde a un control no inmunizado.

Se observa que la respuesta humoral contra el epítipo en cuestión comienza a decaer tras las 4 semanas del primer refuerzo en los ratones inmunizados con el péptido soluble. En los animales inmizados con la quimera, por el contrario, la respuesta continúa en aumento entre las 4 y 6 semanas. Esta diferencia es relevante cuando se desea inducir respuestas inmunes perdurables en el tiempo, objetivo central de toda estrategia de vacunación. Es posible que esta diferencia cinética obedezca a una permanencia más prolongada de la quimera en el animal, debida a su alta estabilidad.

Ratones inmunizados con LS-RSVM, por otro lado, desarrollaron una fuerte respuesta humoral contra el mimotopo insertado en la quimera (Fig. 30).

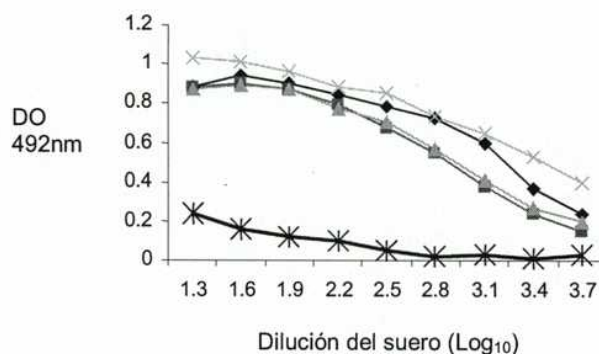


Figura 36. Respuesta contra el péptido insertado en LS-RSVM de cuatro ratones inmunizados con esta quimera, ensayada por ELISA. La línea inferior representa un ratón control, no inmunizado.

Se observa que los sueros de ratones inmunizados reconocen específicamente al mimotopo hasta diluciones mayores a $1/5000$ ($1/10^{3.7}$). En un ensayo posterior, se demostró que estos sueros reconocen efectivamente a la partícula viral de RSV completa, a niveles comparables con sueros de ratones inmunizados con el virus. Estos resultados sugieren que la quimera sería capaz de inducir una fuerte respuesta humoral neutralizante contra el virus respiratorio sincicial.

Los resultados mostrados en esta sección, si bien corresponden a ensayos preliminares, . La aplicabilidad de las quimeras en estos modelos se sigue estudiando en colaboración con los grupos de trabajo mencionados.

Cisticercosis (LS-KETc1, LS-KETc12 y LS-GK1)

Las quimeras LS-KETc1, LS-KETc12 y LS-GK1 están siendo evaluadas por el laboratorio de la Dra. Edda Sciutto, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los péptidos insertados en estas quimeras están siendo ensayados por este laboratorio como potencial vacuna contra la cisticercosis en cerdos. La cisticercosis causada por *Taenia solium* es una enfermedad parasítica de importantes consecuencias sobre la salud y economía humanas. Su alta prevalencia y la precaria situación económica de las zonas rurales donde es endémica hacen necesaria la implementación de programas sistemáticos de erradicación incluyendo vacunación de porcinos de manera de interrumpir

efectivamente la transmisión. Se encuentra en desarrollo una vacuna sintética contra la cisticercosis en cerdos (19). La vacuna se basa en tres péptidos (GK-1, KETc1 y KETc12, de 18, 12 y 8 aminoácidos respectivamente) y redujo en un 52,6% la prevalencia de cisticercosis y en un 98,7% la intensidad de infección con cistos viables. Los ensayos preliminares de protección se realizan en el modelo murino de infección por *Taenia crassiceps*. Se está evaluando la capacidad de las quimeras sintetizadas de inducir respuestas celulares y humorales y de proteger contra el parásito.

CONCLUSIONES

El presente trabajo constituye la primera etapa en el desarrollo de un nuevo *carrier* antigénico. Como tal, resulta potencialmente aplicable tanto como herramienta para la obtención de anticuerpos contra antígenos peptídicos como en el desarrollo de nuevas vacunas acelulares y terapias inmunológicas.

El sistema se basa en el reemplazo por ingeniería genética del extremo N-terminal de la lumazina sintetasa de *Brucella abortus* por péptidos contra los cuales se desea generar una respuesta inmune.

Construcción de los genes quiméricos

La optimización de los tiempos y costos asociados a la aplicación de una herramienta en desarrollo no es, desde ya, un tema menor. Si bien la obtención de un gen quimérico cualquiera es un proceso potencialmente lento, se buscó en el presente trabajo desarrollar un sistema que minimice el trabajo de biología molecular necesario para la construcción de las quimeras. El sistema tipo *cassette* desarrollado involucra básicamente una reacción de ligación seguida de un *screening* rápido por *colony*-PCR, pudiendo este proceso completarse en menos de una semana de trabajo. El vector digerido necesario para la ligación puede producirse en cantidad y almacenarse ya purificado por gel como un reactivo.

Con este método se obtuvo un total de ocho genes quiméricos, confirmados por secuenciación automática de su marco de lectura completo.

Expresión de las quimeras

Como se explicó en la introducción, el extremo N-terminal de la LS no contribuiría a su plegamiento nativo. Esta hipótesis debía sin embargo corroborarse experimentalmente. El primer resultado a determinar era que el reemplazo del extremo N-terminal de la BLS recombinante no afectase su nivel de expresión en *E. coli*.

Las ocho quimeras ensayadas se expresaron correctamente, según resultados obtenidos por SDS-PAGE.

Se observaron diferencias en la distribución de proteína recombinante entre cuerpos de inclusión y fracción citoplasma/periplasma. Sin embargo ésta resultó de por sí

dependiente de las condiciones de crecimiento e inducción del cultivo y no se demostró un efecto directo del extremo N-terminal sobre la misma.

Purificación de las quimeras

Aún expresándose correctamente, el replegamiento de las quimeras y su purificación podían verse comprometidas.

De las ocho quimeras expresadas, seis fueron replegadas y purificadas exitosamente, obteniéndose rendimientos de purificación comparables con los habituales para BLS. Estas fueron LS-OMP31, LS-KETc1, LS-KETc12, LS-RSVM, LS-MEAL y LS-MEAM.

LS-TRP2, por otro lado, pudo replegarse a partir de cuerpos de inclusión y purificarse aunque con bajo rendimiento. La cromatografía de exclusión molecular mostró a su vez que esta quimera se pliega como pentámero. Sin embargo, la proteína presentó una fuerte tendencia a precipitar, muy probablemente debido a la extrema hidrofobicidad del péptido insertado (cuya secuencia se muestra en Resultados). Esto dificultó mantener a la proteína concentrada en solución.

LS-GK1, por último, no pudo replegarse de cuerpos de inclusión. A su vez, la proteína presente en la fracción citoplasmática eluyó de la cromatografía de exclusión molecular en un volumen próximo al que correspondería a un monómero. Estos resultados hacen suponer que esta quimera no adoptaría, en las condiciones ensayadas, un plegamiento nativo.

El estudio de estas quimeras continúa y se espera encontrar condiciones que permitan purificarlas de manera de extender la aplicabilidad del sistema en casos en que se desee insertar péptidos hidrofóbicos.

Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad demuestran que las quimeras ensayadas son proteínas tan estables como la BLS, con valores de ΔG de desplegamiento del orden de los 340 KJoule/mol y T_m aparente de casi 90°C. Sólo una de las quimeras ensayadas, LS-MEAL, mostró una diferencia significativa en su valor de ΔG de desplegamiento.

De los resultados obtenidos se deduce que el reemplazo del extremo N-terminal de la BLS no compromete por regla general su estabilidad. Es posible sin embargo que algunos péptidos tengan efecto sobre la misma y dicho efecto dependerá de las propiedades de la secuencia insertada.

Inmunogenicidad de LS-OMP31

La inmunogenicidad del péptido presentado en LS-OMP31 se estudió en ratones y un conejo. Se demostró que la quimera es capaz de inducir fuertes respuestas de anticuerpos contra la proteína OMP31, de la cual proviene la secuencia del péptido insertado. Se pudo obtener asimismo fuertes respuestas inmunizando ratones con la quimera sin adyuvantes. Dada la toxicidad propia de las sustancias adyuvantes este resultado es de extrema importancia en cuanto a la aplicabilidad del sistema en el desarrollo de inmunógenos para uso en humanos.

La obtención de anticuerpos contra proteínas integrales de membrana resulta por lo general más problemático que para proteínas solubles. El suero del conejo inmunizado con LS-OMP31 reconoció específicamente tanto a OMP31 recombinante desnaturalizada como a la bacteria *B. melitensis*, la cual expresa esta proteína en su membrana externa. En acuerdo con resultados en la literatura, el suero reconoció a la cepa rugosa de la bacteria, donde el epítipo en cuestión está expuesto, y no a la cepa lisa.

Quimeras mixtas

Se ensayó la posibilidad de obtener pentámeros mixtos, compuestos por monómeros provenientes de distintas quimeras. Para esto se aprovechó el carácter reversible de la desnaturalización por guanidinio de la LS. Se obtuvo con éxito una muestra de quimeras mixtas entre LS-OMP31 y LS-KETc1. Los resultados obtenidos sugieren que la muestra se compone de una variedad de pentámeros de distinta composición de monómeros.

A las altas concentraciones de proteína utilizadas en el ensayo, el rendimiento del proceso de desplegado/replegado seguido resulta relativamente bajo (20%). La obtención de quimeras mixtas se intentó también a partir de las proteínas no purificadas (resultados no mostrados). Para esto, se tomaron directamente las fracciones de cuerpos de inclusión en urea 8M, se mezclaron y se replegó la muestra por diálisis. La muestra se analizó por

MonoQ, y se observó un resultado equivalente al mostrado en el presente trabajo, indicando que es posible obtener quimeras mixtas a partir de la fracción de cuerpos de inclusión no purificada.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha establecido una clara relación entre la organización molecular de los antígenos protéicos y su inmunogenicidad. El orden de oligomerización de una proteína podría influenciar la inmunogenicidad en al menos dos maneras. Una de ellas es la capacidad de entrecruzar eficientemente a receptores de linfocitos B antígeno-específicos. Un epítotope repetitivo y espacialmente ordenado produciría entonces una señal de activación fuerte para estas células, induciendo su proliferación y la secreción de anticuerpos antígeno-específicos. A su vez, la activación de linfocitos B permite la activación de linfocitos T, los cuales contribuyen a la generación de memoria inmune. Por otro lado, la organización molecular homo-polimérica puede implicar una mayor estabilidad, aumentando así la vida media del antígeno en el animal inmunizado y favoreciendo la activación de linfocitos.

Esto plantea un interrogante en cuanto al tamaño del arreglo cuaternario óptimo para la inmunogenicidad. En particular, de existir un tamaño crítico a partir del cual tamaños mayores no resulten en una mayor inmunogenicidad, esto debería tenerse en cuenta a la hora de elegir proteínas *carrier* para el desarrollo de vacunas por ingeniería de proteínas. En el caso de la proteína L1 de la cápside viral del papilomavirus canino, se comprobó que la forma pentamérica de L1 resulta tan inmunogénica como su forma icosaédrica, de mayor orden molecular. A partir de estos resultados, los autores plantean que la forma pentamérica, expresada en bacterias, constituye una alternativa económica a las VLPs para el desarrollo de una vacuna contra papilomavirus en humanos. La lumazina sintetasa de *Brucella* podría aventajar a las VLPs como *carrier* para el desarrollo de inmunógenos quiméricos: 1) Presenta una alta inmunogenicidad tanto humoral como celular, modulable por la elección de adyuvante o por inmunización vía ADN. 2) La proteína recombinante es expresada en *E. coli* de donde se purifica fácilmente a partir del replegado de cuerpos de inclusión, obteniéndose rendimientos de hasta 40 mg por litro de cultivo. 3) El pentámero de LS sería capaz de acomodar péptidos de mayor tamaño que las VLPs, sin afectarse su estabilidad ni inmunogenicidad. 4) En los casos ensayados, los sueros de animales inmunizados con las quimeras reconocen específicamente a las proteínas nativas de donde provienen los péptidos insertados. 5) La proteína es fácilmente cristalizable, lo cual permitiría entender la relación entre la conformación de los péptidos insertados y su inmunogenicidad. 6) La LS es altamente inmunogénica aún en ausencia de adyuvantes,

posibilitando potencialmente el uso de diferentes vías de inmunización (intranasal, oral) y su aplicación en vacunas en humanos, donde el uso de adyuvantes es muy limitado dados sus efectos tóxicos.

La presentación de diferentes péptidos en la misma molécula *carrier*, mediante la obtención de quimeras mixtas, abre la posibilidad para la construcción de inmunógenos polivalentes, las cuales combinarían el efecto de los péptidos individuales. A su vez, esta propiedad puede aprovecharse para modular la respuesta inmune. En particular, existen péptidos descritos con la propiedad de inducir la internalización de proteínas al citoplasma de células eucariotas (Lindgren 2000; Pooga 2001). Un pentámero mixto entre una quimera de interés y una construida con este tipo de péptido permitiría la generación de respuesta T citotóxica contra el péptido de interés. A su vez, esta estrategia permite generar pentámeros con distinta cantidad de péptidos, lo cual permitirá estudiar la relación entre la densidad de la presentación de un epítope y su inmunogenicidad.

En el presente trabajo de tesis se demuestra que la inserción de distintos péptidos en el extremo N-terminal de la LS no afecta su estructura, su estabilidad, su expresión ni su repliegado. Las quimeras construidas indujeron fuertes respuestas humorales específicas contra los péptidos insertados y, más aún, contra las proteínas contra las cuales se deseaba obtener respuesta en su estado nativo. Ensayos preliminares indican que las quimeras serían capaces de proteger eficientemente contra organismos patógenos. Los resultados obtenidos demuestran la validez de la estrategia seguida y establecen a la lumazina sintetasa de *Brucella abortus* como un *carrier* antigénico eficaz y versátil para el desarrollo de inmunógenos y vacunas acelulares.



DIEGO A. LAPLAGNE



FERNANDO
GOLDBLUM

REFERENCIAS

- Bachmann MF, Hengartner H, et al. (1995). "T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction?" Eur J Immunol **25**(12): 3445-51.
- Bachmann MF, Rohrer UH, et al. (1993). "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." Science **262**(5138): 1448-51.
- Bachmann MF, Rohrer UH, et al. (1994). "T helper cell unresponsiveness: rapid induction in antigen-transgenic and reversion in non-transgenic mice." Eur J Immunol **24**(12): 2966-73.
- Borisova G, Borschukova Wanst O, et al. (1996). "Spatial structure and insertion capacity of immunodominant region of hepatitis B core antigen." Intervirology **39**(1-2): 16-22.
- Bowden RA, Cloeckart A, et al. (1995). "Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry." Infect Immun **63**(10): 3945-52.
- Bowden RA, Cloeckart A, et al. (1995). "Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*." J Med Microbiol **43**(5): 344-7.
- Braden BC, Velikovsky CA, et al. (2000). "Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*." J Mol Biol **297**(5): 1031-6.
- Corbel MJ (1996). "Reasons for instability of bacterial vaccines." Dev Biol Stand **87**: 113-24.
- Dintzis HM, Dintzis RZ, et al. (1976). "Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(10): 3671-5.
- Ellis RW (1996). "The new generation of recombinant viral subunit vaccines." Curr Opin Biotechnol **7**(6): 646-52.
- Fehr T, Skrastina D, et al. (1998). "T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9477-81.
- Feliu JX, Carbonell X, et al. (2000). "Successful mimicry of a complex viral antigen by multiple peptide insertions in a carrier protein." Febs Lett **474**(1): 87-92.
- Fischer M, Haase I, et al. (2002). "Biosynthesis of riboflavin: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*." Eur J Biochem **269**(2): 519-26.
- Gerhardt S, Haase I, et al. (2002). "The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase." J Mol Biol **318**(5): 1317-29.
- Goldbaum FA, Leoni J, et al. (1993). "Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis." J Clin Microbiol **31**(8): 2141-5.

- Goldbaum FA, Rubbi CP, et al. (1992). "Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses." J Clin Microbiol **30**(3): 604-7.
- Goldbaum FA, Velikovsky CA, et al. (1999). "The 18-kDa cytoplasmic protein of *Brucella* species --an antigen useful for diagnosis--is a lumazine synthase." J Med Microbiol **48**(9): 833-9.
- Hemmen F, Weynants V, et al. (1995). "Cloning and sequence analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the 17-kilodalton antigen that it encodes." Clin Diagn Lab Immunol **2**(3): 263-7.
- Hsu SC, Chargelegue D, et al. (1998). "Reduction of respiratory syncytial virus titer in the lungs of mice after intranasal immunization with a chimeric peptide consisting of a single CTL epitope linked to a fusion peptide." Virology **240**(2): 376-81.
- Janeway CA The Immune System in Health and Disease, Garland.
- Kratz PA, Bottcher B, et al. (1999). "Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 1915-20.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lindgren M, Gallet X, et al. (2000). "Translocation properties of novel cell penetrating transportan and penetratin analogues." Bioconjug Chem **11**(5): 619-26.
- Meining W, Mortl S, et al. (2000). "The atomic structure of pentameric lumazine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue." J Mol Biol **299**(1): 181-97.
- Mok YK, de Prat Gay G, et al. (1996). "Equilibrium dissociation and unfolding of the dimeric human papillomavirus strain-16 E2 DNA-binding domain." Protein Sci **5**(2): 310-9.
- Mortl S, Fischer M, et al. (1996). "Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*." J Biol Chem **271**(52): 33201-7.
- Nieba L (2000). "A New Generation of Vaccines." Mod. Asp. Immunobiol. **1**(2): 36-39.
- Nossal GJV (1998). Vaccines. Fundamental Immunology. W. E. Paul, Lippincott-Raven: 1387-1425.
- Olszewska W, Obeid OE, et al. (2000). "Protection against measles virus-induced encephalitis by anti-mimotope antibodies: the role of antibody affinity." Virology **272**(1): 98-105.
- Pace CN (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." Methods Enzymol **131**: 266-80.
- Persson K, Schneider G, et al. (1999). "Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly." Protein Sci **8**(11): 2355-65.
- Pooga M, Kut C, et al. (2001). "Cellular translocation of proteins by transportan." FASEB J **15**(8): 1451-3.

- Raz R, Dagan R, et al. (1996). "Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in children." Vaccine **14**(3): 207-11.
- Ritsert K, Huber R, et al. (1995). "Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution." J Mol Biol **253**(1): 151-67.
- Steward MW (2001). "The development of a mimotope-based synthetic peptide vaccine against respiratory syncytial virus." Biologicals **29**(3-4): 215-9.
- Valenzuela P, Medina A, et al. (1982). "Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast." Nature **298**(5872): 347-50.
- Velikovsky CA, Cassataro J, et al. (2002). "A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice." Infect Immun **70**(5): 2507-11.
- Vizcaino N, Cloeckert A, et al. (1996). "Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein." Infect Immun **64**(9): 3744-51.
- Vizcaino N, Kittelberger R, et al. (2001). "Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species." Infect Immun **69**(11): 7020-8.
- Wolff JA, Malone RW, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Yuan H, Estes PA, et al. (2001). "Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection." J Virol **75**(17): 7848-53.
- Zhang X, Meining W, et al. (2001). "X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons." J Mol Biol **306**(5): 1099-114.