

Tesis de Posgrado

Expresión de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y su rápida purificación

Moreno, Juan Ignacio

1992

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Moreno, Juan Ignacio. (1992). Expresión de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y su rápida purificación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2492_Moreno.pdf

Cita tipo Chicago:

Moreno, Juan Ignacio. "Expresión de antígenos de *Trypanosoma cruzi* en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y su rápida purificación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2492_Moreno.pdf

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

**• EXPRESION DE ANTIGENOS DE *Trypanosoma cruzi*
EN *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*
Y SU RAPIDA PURIFICACION •**

Tesis

Autor : Juan Ignacio Moreno.

Director : Dr. Víctor Elías Nahmod.

Lugar de trabajo : BioSidus S.A.

1992

Tesis
2492
y.2.

**para optar por el título de Doctor en Ciencias
Biológicas.**

Parte de los resultados de esta tesis doctoral, fueron
publicados en:

World Journal of Microbiology and Biotechnology

(1991) 7, 316-323

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, al Señor Marcelo Argüelles por todo el apoyo que me ha brindado.

Al Dr Victor Nahmod por su asesoramiento y ayuda incondicional.

También al los Doctores Marcelo Criscuolo, Miguel Carcagno, Alejandro Vidal, Mario Malaspina y Miriam Denegri por la valiosa colaboración que me han prestado.

Al Dr Norberto Judewitz por su valorable crítica a este trabajo de tesis.

A Mario Caputo, Dora Figueroa, Daniel Mella y a Elida por la constante ayuda que me han brindado desde el comienzo.

I N D I C E

| | Página |
|---------|--|
| 1 | Resumen.....1 |
| 2 | Introducción: 1ª parte.....5 |
| 2.1 | Generalidades.....5 |
| 2.2 | Experimentos de protección.....7 |
| 2.3 | Clonado de genes que codifican antígenos de <i>T.cruzi</i>8 |
| 2.4 | Perspectivas para el desarrollo de una vacuna.....11 |
| 2.5 | Antígenos clonados mas representativos.....12 |
| 2.5.1 | El antígeno #1.....13 |
| 2.5.2 | El antígeno #2.....14 |
| 2.5.3 | El antígeno #13.....15 |
| 2.5.4 | El antígeno #30.....15 |
| 2.5.5 | El antígeno #7 (SAPA).....16 |
| 2.5.5.1 | El SAPA como candidato para una vacuna.....17 |
| 3. | Introducción: 2ª parte.....19 |
| 3.1 | Expresión, recuperación y purificación de proteínas recombinantes como fusiones a apéndices de afinidad.....19 |
| 3.2 | Tipos de apéndice de afinidad.....20 |
| 3.2.1 | Enzimas.....20 |
| 3.2.2 | Dominios que unen carbohidratos.....22 |
| 3.2.3 | Dominios de unión a biotina.....23 |
| 3.2.4. | Epitopes antigénicos.....23 |

| | Página |
|---------|---|
| 3.2.5 | Oligopéptidos cargados.....24 |
| 3.2.6 | Residuos de polihistidina.....24 |
| 3.2.7 | Fusiones con la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>.....25 |
| 3.2.7.1 | La proteína A como apéndice de afinidad.....25 |
| 3.2.7.2 | Vectores para la expresión de fusiones con la proteína A.....28 |
| 3.2.7.3 | Elección del vector y el hospedador.....34 |
| 3.2.7.4 | Recuperación de la proteína sin el apéndice de afinidad.....35 |
| 4 | Objetivos.....38 |
| 4.1 | Estudio de un sistema de expresión eficiente para cuatro antígenos de <i>T. cruzi</i>38 |
| 4.2 | Fusión génica de antígenos distintos.....39 |
| 5 | Materiales y Métodos.....41 |
| 5.1 | Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....41 |
| 5.2 | Subclonado de los fragmentos de ADN en los vectores de expresión.....43 |
| 5.2.1 | Enzimas.....43 |
| 5.2.2 | Preparación de plásmidos y fragmentos de ADN.....43 |
| 5.2.3 | Inserción de los fragmentos a los vectores de expresión.....44 |
| 5.3 | Transformación en <i>S. aureus</i>46 |
| 5.3.1 | Medios y reactivos para la transformación de <i>S. aureus</i>48 |
| 5.4 | Expresión de los antígenos fusionados a SPA.....53 |

| | Página |
|----------|---|
| 5.4.1 | Inmunoprecipitación en gel.....54 |
| 5.4.2 | Rastreo inmunológico de colonias.....55 |
| 5.4.3 | Ensayo por Dot blot.....56 |
| 5.5 | Preparación de las fusiones.....56 |
| 5.5.1 | Expresión en <i>E.coli</i> y <i>S.aureus</i>56 |
| 5.5.2 | Purificación de las fusiones por cromato- grafía de afinidad.....58 |
| 5.6 | Obtención de la proteína auténtica.....59 |
| 5.6.1 | Proteólisis específica.....59 |
| 5.6.2 | Ulterior purificación.....60 |
| 5.7 | Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y <i>Wester</i> <i>blot</i>60 |
| 5.8 | Cepas hospedadoras.....63 |
| 6 | Resultados y Discusión.....64 |
| 6.1 | Análisis de las secuencias.....64 |
| 6.1.1 | Sitios de restricción.....64 |
| 6.1.2 | Perfiles hidropáticos.....67 |
| 6.1.3 | Sitios sensibles a proteasas específicas.....71 |
| 6.2 | Expresión del antígeno 1 fusionado a SPA en <i>E.coli</i>72 |
| 6.2.1 | Subclonado del fragmento de 1.3 Kb al vector de expresión.....72 |
| 6.2.2 | Producción la fusión SPA-Ag1 en <i>E.coli</i>75 |
| 6.3 | Expresión de la fusión SPA-Ag1 en <i>S.aureus</i>76 |
| 6.3.1 | Transformación de <i>S.aureus</i> SA113.....76 |
| 6.3.2 | Producción de la fusión SPA-Ag1 en <i>S.aureus</i>80 |
| 6.4 | Estudios comparativos entre ambas especies.....83 |

VII

| | Página |
|-------|--|
| 6.4.1 | Expresión y purificación de la fusión SPA-Ag1 en cantidades preparativas.....83 |
| 6.4.2 | Análisis de la fusión por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida85 |
| 6.5 | Obtención de la proteína libre de SPA.....90 |
| 6.5.1 | Tratamiento con enteropeptidasa.....90 |
| 6.5.2 | Ulterior purificación del antígeno.....95 |
| 6.6 | Producción del antígeno 30.....99 |
| 6.7 | Producción del antígeno 13.....150 |
| 6.8 | Producción del SAPA.....115 |
| 6.8.1 | Modificaciones en el ADN.....120 |
| 6.9 | Fusión de antígenos distintos.....139 |
| 6.9.1 | Fusión del Ag1 con el Ag30.....139 |
| 6.9.2 | Fusión del Ag1 y Ag30 con el SAPA.....145 |
| 7 | Conclusiones.....153 |
| 8 | Perspectivas.....156 |
| 9 | Abreviaturas.....159 |
| 10 | Referencias.....161 |

1 - RESUMEN

Siendo la enfermedad de Chagas es uno de los problemas endémicos más importantes en Latinoamérica, el clonado de antígenos del agente causal, *Trypanosoma cruzi*, ya sea para el diagnóstico o el desarrollo de una vacuna, fue uno de los objetivos más importantes.

Uno de los problemas que a menudo se presentan es la forma de obtener proteínas por técnicas de ADN recombinante, en niveles que puedan ser llevados a escala industrial. En este caso particular, se ha estudiado la forma de expresar eficientemente y purificar cuatro antígenos clonados los que poseen un alto índice de reacción frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (Ibañez y col 1987).

La expresión y purificación de estas proteínas estuvo basada en un sistema de fusión con la Proteína A de *Staphylococcus aureus*. Los vectores de expresión usados en este trabajo de tesis fueron los de la serie pRIT₆ (Nilsson y col, 1990) y sus hospedadores fueron *Escherichia coli* (*E.coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (Löwenadler y col 1986), siendo este último muy poco estudiado en la expresión de proteínas recombinantes (Nilsson y col, 1990).

Una vez que las fusiones fueron expresadas, estas pudieron ser recuperadas y purificadas por cromatografía de afinidad IgG-Sepharosa en un solo paso.

El esquema básico de expresión y purificación consistió en lo siguiente:

- 1) Expresión de la proteína fusión por la bacteria hospedadora ya sea *S.aureus* como *E.coli*.
- 2) Recuperación de la fusión en extractos celulares o en el medio de cultivo libre de células por cromatografía de afinidad IgG-Sepharosa.
- 3) Proteólisis enzimática específica en el sitio de unión de la proteína A con el antígeno.
- 4) Eliminación de la proteína A liberada y de la fusión remanente por un segundo pasaje por la columna de cromatografía de afinidad, recuperándose el antígeno auténtico en el efluente.

Los resultados en esta primera etapa permitieron extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Las fusiones son principalmente encontradas dentro de la célula en *E.coli*, mientras que en *S.aureus* son excretadas al medio de cultivo.
- 2) Las proteínas de fusión son fácilmente rescatadas y purificadas por cromatografía de afinidad.
- 3) Los niveles de expresión fueron de una magnitud tal que pueden ser llevados a escala industrial tanto en *E.coli* como en *S.aureus*.
- 4) *S.aureus* probó ser el hospedador de elección porque la degradación proteica fue menor y se evitó el proceso de ruptura celular. Esta última ventaja hace que sean

procesables grandes volúmenes de cultivo en forma mucho mas rápida y menos costosa.

5) Salvo en un solo caso, la proteólisis específica separó en forma eficiente, ambas mitades de las fusiones.

6) La ulterior purificación del antígeno auténtico post-clivado por un segundo pasaje por la columna de cromatografía de afinidad, mostró una recuperación de aproximadamente el 80%.

En un primer paso, la producción de estos antígenos, por este sistema, para ser usados como reactivo de diagnóstico, mostró que puede llevarse a escala industrial, por los niveles de expresión la facilidad de su manejo y su rapidez.

Las hidrofobicidad pareció influir en la degradación de algunas fusiones durante la expresión en este sistema, cuya forma de actuar fue discutida.

La metodología empleada para cada antígeno en particular los que en principio serían cuatro, podría ser simplificada aún mas. Esto fué logrado a través de construcciones en la que dos o mas genes fueron fusionados para producir una única proteína que conservaría la misma capacidad de reaccionar con antisueros de pacientes como lo hacen cada uno de ellos por separado. La idea fue aproximarse a la obtención de una poliproteína única que represente a todos los antígenos a disposición de forma tal de expresar, recuperar y purificar todo el "repertorio" en un solo procedimiento.

Los resultados obtenidos hasta aquí mostraron que además de ser posible la fusión de tres antígenos distintos, la

inmunoreactividad mostraron que cada antígeno en la molécula única, reaccionó con sus correspondientes antisueros específicos sin interferencia por los demás, demostrando, en primera instancia, que este tipo de quimera puede ser llevada a una prueba de campo. Además queda abierta la posibilidad de que quimeras como las que se construyeron en este trabajo, puedan contribuir a experimentos de protección.

2 .- INTRODUCCION : 1 a PARTE

2.1 - GENERALIDADES

El mal de Chagas es una de las enfermedades endémicas mas importantes que afecta a millones de personas en Latinoamérica. El agente causal es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual tiene un complejo ciclo de vida que involucra dos estadios en el insecto vector (*Triatoma infestans*): epimastigote, en el intestino medio y tripomastigote metacíclico en el recto. En el mamífero hospedador, también presenta dos estadios: tripomastigote, en el torrente sanguíneo y amastigote como forma intracelular.

Cuando el parásito ingresa a la sangre del huésped, existe un período agudo de parasitemia, luego del cual, el crecimiento es controlado por la respuesta inmune del hospedador. Si bien se ha descrito una importante inmunosupresión durante la fase temprana de la infección (Petry & Eisen, 1989), pudo establecerse la producción de varias poblaciones de anticuerpos (Reyes y col, 1990). Otros autores también han sugerido que la respuesta humoral lleva a un brusco descenso en la parasitemia (Scott, 1981; Trischman, 1984). Los tripomastigotes son capaces de invadir células dando lugar a la forma amastigote la que replica intracelularmente. La infección permanece silenciosa a lo largo de muchos años. Durante esta fase crónica, los parásitos son difícilmente detectados en la sangre de los pacientes quienes desarrollan lesiones cardíacas y

gastrointestinales en forma progresiva. Aunque no se han establecido definitivamente los mecanismos por los cuales estas lesiones se llevan a cabo, se ha postulado un proceso de autoinmunidad durante la fase crónica de la enfermedad (Hudson, 1985; Kierszenbaum, 1985-1986).

Se han realizado estudios a fin de establecer la composición glicoproteica antigénica superficial de *T. cruzi*, a través de iodación o marcación radioactiva *in vivo* seguido de inmunoprecipitación con antisuero (Snary & Hudson, 1979; Araujo & Remington, 1981; Nogueira y col, 1982; Andrews y col, 1984; Gonzalez y col, 1984; Contreras y col, 1985; Dragón y col, 1985), cromatografía de afinidad a lectina (Dragon y col, 1985; Katzin & Colli, 1983) o reacción con anticuerpos monoclonales (Snary y col, 1981; Kirchhoff y col, 1984; Orozco 1984; Teixeira & Yoshida 1986; Wrightsman y col, 1986). Los primeros reportes describen una glicoproteína mayor presente en los tres estados del parásito (Snary & Hudson 1979). Ultimamente, se han descrito varias de éstas, algunas son específicas de estadio (Zweerink y col, 1984; Yoshida 1986; Nogueira y col, 1982; Teixeira & Yoshida, 1986). Entre ellas, una proteína de 85 KDa presente solo en tripomastigotes fue en parte relacionada con los procesos de internalización en células de mamífero (Zingales y col, 1985). Otra proteína del mismo peso molecular ha sido caracterizada como un receptor a fibronectina (Ali Ouaiissi y col, 1986).

2.2 - EXPERIMENTOS DE PROTECCION

Dado que los tripomastigotes, presentes en la sangre, son capaces de internalizarse en la célula del huésped, deberán llevar en su superficie moléculas que permitan la interacción con esta (Zingales y col, 1985; Ali Ouaiissi y col, 1986). Estas moléculas despertarán una respuesta inmune protectora contra subsiguientes infecciones (Brener, 1986).

Se han descrito anticuerpos protectores o líticos detectados por transferencia pasiva de suero o células de animales crónicamente infectados o inmunizados (Burgess & Hanson, 1979; Scott 1981; Krettli & Brener, 1982; Krettli y col 1984; Trischmann, 1984; Lima-Martins y col 1985), en animales inmunizados con tripomastigotes atenuados (Zweerink y col, 1984; Okanla y col 1982; Basombrio & Arredes, 1987), en animales inmunizados con tripomastigotes muertos (Yoshida, 1986; Ritter & Rowland, 1984; Andrews y col. 1985) y en animales inmunizados con fracción flagelar del parásito (Ruiz y col, 1985). Sorprendentemente no se han obtenido los mismos resultados cuando la inmunización se llevó a cabo con epimastigotes (Krettli & Brener, 1982; Zweerink y col 1984; Yoshida 1986). Recientemente, se ha reportado que anticuerpos contra la mayor cistein proteinasa, llamada por Cazzulo y sus colaboradores cruzipaina, bloquean parcialmente la penetración del parásito a los macrófagos (Souto-Padrón y col, 1990).

En la mayoría de los casos la protección es parcial, pero esto no significa que no pueda ser mejorada si se

obtienen mejores antígenos, adyuvantes y/o protocolos de inmunización. La presunta respuesta de autoinmunidad elimina la posibilidad de usar mezclas complejas o fracciones no definidas obtenidas directamente del parásito como componentes de una vacuna. En este sentido, hay indicios de que antígenos purificados o anticuerpos contra antígenos definidos pueden proteger en contra de la infección. (Scott & Snary 1979; Snary, 1983; Scott y col, 1984 y 1985; Yoshida y col, 1989; Ouaisi y col, 1990; Ruiz y col, 1990) Estos y otros antígenos podrían ser candidatos para una vacuna si los posibles efectos de una respuesta autoinmune son descartados.

2.3 - CLONADO DE GENES QUE CODIFICAN ANTIGENOS DE *T. cruzi*

Los problemas que ha menudo suelen presentarse para los ensayos de diagnóstico y el desarrollo de un sistema de vacunación, son la disponibilidad de proteínas antigénicas purificadas a homogeneidad, que no compartan epitopes con otros parásitos y que puedan obtenerse en cantidades suficientes ya que 1) Las cantidades presentes en el parásito son mínimas y por lo tanto se requerirá procesar una masa celular demasiado grande; 2) Si se emplean poblaciones heterogéneas de antígenos, el riesgo de obtener reacciones cruzadas con otras infecciones parasitarias es considerable. y 3) El uso de mezclas complejas dan lugar a falsos positivos y falsos negativos (Frasch y col, 1990). La laboriosidad que todo esto implicaría y el riesgo (siempre presente) de

contraer la enfermedad, son otros problemas dignos de tener en cuenta.

El empleo de técnicas de ADN recombinante, parecería una alternativa válida para la solución a las cuestiones mencionadas anteriormente. Durante los últimos años, varios genes de antígenos de *T. cruzi* han sido clonados y caracterizados por rastreo inmunológico de bibliotecas de ADN (Dragón y col 1987; Ibañez y col, 1987) y de bibliotecas de ADN-copia (Levin y col 1989) con sueros de pacientes y de animales infectados. Muchos de estos contienen motivos de secuencia repetidas en la región codificante, algunos de los cuales serán descritos en detalle mas adelante.

Varios anticuerpos aparecen en altos títulos durante la infección y sus correspondientes antígenos fueron clonados en forma independiente por distintos autores. En este caso tenemos el antígeno #30 (Ibañez y col 1988) el CRA (Lafaille y col, 1989), JLB (Levin y col, 1989) y el ICR27 (Hoft y col 1989). Por otro lado, el antígeno #1 (Ibañez y col 1988), el FRA (Lafaille y col 1989) y el JL7 (Levin y col 1989). El #2 (Ibañez y col. 1988) y el ICR 39 (Hoft y col, 1989). Y por último, el antígeno #36 (Ibañez y col 1988) y el JL9 (Levin y col 1989). Todos estos serían muy buenos candidatos para ser usados como reactivo de diagnóstico.

Hasta la fecha, han sido pocos los antígenos clonados que fueron totalmente secuenciados. Entre éstos se incluyen proteínas de "heat shock" (Dragón y col 1987; Requena y col, 1988; Engman y col, 1989), una proteína-P ribosomal (Schifman

y col 1990) la que se supone, estar involucrada en los procesos de autoinmunidad (Levin y col, 1989), un antígeno que se libera en la fase aguda: SAPA (Pollevick y col, 1991), y la cruzipaina (Cazzulo y col 1990). Cuando las secuencias de los genes aislados a partir de diferentes cepas de *T.cruzi* son analizadas, puede observarse que las unidades de repetición son casi idénticas (Ibañez y col, 1988; Lafaille y col 1989; Levin y col, 1989; Hoft y col 1989); de lo cual se concluye que los dominios repetitivos son altamente conservados y cualquiera que sea su función, sólo pueden tolerar un grado mínimo de diversidad. De nuevo, este hecho hace que estas proteínas sean muy útiles para su uso en el diagnóstico.

Se debe tener en cuenta que muchas de las secuencias de antígenos de *T.cruzi* reportadas, son parciales y confinadas principalmente a las regiones repetidas. Existe por los tanto el riesgo de una confusión en la clasificación de estas proteínas. La observación de que varios genes de antígenos de superficie pueden ser miembros de una familia multigénica con variaciones en la secuencia entre copias individuales, podría traer complicaciones. Esto ha sido particularmente estudiado para los antígenos de 85 KDa (Peterson y col, 1989; Kahn y col, 1990). Por otra parte, ha sido demostrado que ciertos miembros de una familia de genes de antígenos de superficie, contienen regiones repetidas mientras que otros homólogos, pertenecientes a la misma familia no las poseen (Lafaille y col, 1989).

No se han encontrado homología entre unidades repetidas de *T. cruzi*, con otras obtenidas a partir de otros parásitos; con excepción a la unidad de repetición del antígeno #30/JL9, que son idénticos en tamaño y similares en secuencia a una proteína asociada a microtúbulos (MAP) de *Trypanosoma brucei* (Schneider y col, 1988)

Otras proteínas antigénicas con motivos de secuencia repetida, han sido observadas en *T. brucei* (Roditi y col 1987), leishmanias (Wallis y col, 1987) y en gran medida, en *Plasmodium* sp (Kemp y col 1987). El hecho de que la composición antigénica de estos parásitos sean principalmente motivos de unidades repetidas (fuertemente antigénicas) condujo a pensar de que se trata de un fenómeno de evasión continua frente al sistema inmune del hospedador. Kemp y sus colaboradores han discutido esta posibilidad en su hipótesis de "cortina de humo" (Kemp y col, 1987). Un mecanismo similar puede darse en la enfermedad de Chagas. De hecho, el procedimiento de rastreo inmunológico usando sueros de pacientes chagásicos o de animales infectados, durante el clonado de antígenos (por bibliotecas de expresión), conduce preferencialmente al aislamiento de proteínas que poseen epitopes repetitivos. (Frasch y col, 1990).

2.4 - PERSPECTIVAS PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA

A partir de toda la información obtenida hasta la fecha, podría decirse que es posible obtener respuestas inmunes que protejan, al menos parcialmente, de la infección.

Así, una vacuna podría ser lograda en base a una mezcla de antígenos aún cuando el desarrollo de la parasitemia sea prevenido solo parcialmente (Frasch y col 1990). Una carga baja de parásitos durante la fase aguda, puede resultar en una moderada fase crónica (Scott & Snary, 1979). De esta forma, quedaría abierta la cuestión de si disminuyendo la carga del parásito, resultaría en una prevención de la enfermedad sintomática.

2.5 - ANTIGENOS CLONADOS MAS REPRESENTATIVOS

Frasch y sus colaboradores han logrado una colección inicial de antígenos clonados a partir de una biblioteca genómica hecha en el fago lambda gtl1 e identificados por rastreo inmunológico con suero de un paciente con enfermedad de Chagas. De 53 clones positivos, se han establecido 10 grupos diferentes (constituídos por uno o varios clones) definidos por experimentos de hibridación cruzada y reacción con anticuerpos seleccionados con los productos de cada clon recombinante. Las proteínas nativas fueron caracterizadas a partir de extractos del parásito con los anticuerpos previamente seleccionados las que entraron en un rango de peso molecular de 85 a mas de 205 KDa. Algunas de estas, fueron detectadas en el estadio de tripomastigote, mientras que otras estaban también presentes en epimastigotes. Los clones de cada grupo, reaccionaron con nueve sueros de conejos infectados con varias cepas de *T.cruzi* y con ocho sueros de pacientes chagásicos, salvo un grupo (compuesto por

un único clon, el 22) que no reaccionó con ninguno de éstos y posteriormente fue descartado. (para una mayor información ver Ibañez y col, 1987).

Posteriormente, un clon de cada grupo, fue analizado por su secuencia nucleotídica, mostrando que siete de ellos contenían motivos de secuencia repetida, ya sea en parte o en la totalidad de la molécula cuya unidad, de longitud variable (desde 5 hasta 68 aminoácidos), estuvo altamente conservada dentro de la misma proteína. Un estudio posterior hecho con sueros de pacientes de Argentina, Brasil y Chile mostró la reacción en alta proporción con seis de estos nueve clones. Prácticamente todos los sueros serían reactivos si se usaran conjuntamente estos seis clones (para mayor información ver Ibañez y col, 1988) de los cuales cinco serán detallados a continuación.

2.5.1- EL ANTIGENO #1

Este antígeno fue también clonado por otros investigadores (ver sección 2.3). El fragmento de ADN posee una longitud de 1.344 pb y es un motivo de secuencia repetida en su totalidad donde el marco abierto de lectura se extiende desde el extremo 5' hasta el extremo 3' flanqueados por sitios *EcoRI*. La unidad posee 68 amino aminoácidos, la que está repetida 6.5 veces. La proteína nativa posee un peso molecular mayor a 205 KDa, aunque no hay concordancia con otros autores (Frasch y col, 1990) y su localización celular es el flagelo del protozoo.

Se han encontrado anticuerpos contra esta proteína en algunos sueros de pacientes agudos (18%), pero casi la totalidad de sueros de pacientes en fase crónica poseen anticuerpos contra esta proteína (Frasch, comunicación personal) lo que la convierte en un excelente reactivo de diagnóstico para la detección de infecciones de este estadio (para mas detalles, ver Affranchino y col 1989).

2.5.2- EL ANTIGENO #2

El fragmento de ADN correspondiente tiene unos 2.500 pb. El marco abierto de lectura se extiende desde el extremo 5' del fragmento clonado hasta la señal de terminación en la posición 1.219 presentando un motivo de secuencia repetida en parte de la molécula. Este comienza a partir del extremo 5' del fragmento y termina en el nucleótido 624. En la proteína, la unidad correspondiente es de 12 aminoácidos, presentando alguna diversidad dentro de la misma

La proteína nativa posee un peso molecular de 85 KDa (Ibañez y col 1987) y es de superficie. Esta reacciona preferentemente con sueros de pacientes crónicos y muy poco con sueros de pacientes agudos (4%), por lo tanto es preferencial su uso para la detección de la fase crónica (Affranchino y col 1989; Frascch y col, 1990).

2.5.3.- EL ANTIGENO #13

Hasta la fecha, no se ha reportado el clonado de este gen en otros laboratorios. El fragmento posee una longitud de aproximadamente 2.200 pb. También presenta un motivo de secuencia repetida la que comienza en el extremo 5' del fragmento clonado y se extiende unos 900 pb, cuya unidad es de 5 aminoácidos y está parcialmente conservada.

La proteína nativa posee, al igual que el #2, un peso molecular de 85 KDa (Ibañez et al) y es de superficie. Los sueros de pacientes agudos y crónicos reaccionan con esta proteína con una frecuencia similar (39% y 40%) (Affranchino y col 1989), haciéndola útil para la detección de ambas fases de la enfermedad

2.5.4 - EL ANTIGENO #30

Varios laboratorios han clonado este antígeno (ver sección 1.3). El fragmento de ADN posee un peso molecular de aproximadamente 650 pb y es un motivo de secuencia repetida en su totalidad donde el marco de lectura se extiende desde el extremo 5' hasta el 3' del fragmento clonado. La unidad en la proteína es de 14 aminoácidos la que se repite unas 16 veces presentando alguna variación. La proteína nativa tiene un peso molecular estimado en unos 205 KDa. (Ibañez y col 1987). Muy pocos sueros de paciente en fase aguda poseen anticuerpos contra esta proteína (4%), mientras que de los pertenecientes a la fase crónica, alrededor de un 45% presentan estos anticuerpos (Affranchino y col, 1989).

2.5.5 - EL ANTIGENO #7 (SAPA)

Este antígeno fue uno de los más estudiados por el grupo de Frasch a causa de la importancia que tiene en la detección de infecciones agudas. Inicialmente, fue llamado #7, y posteriormente SAPA (Shed Acute Phase Antigen) puesto que un 93% de sueros de pacientes agudos, poseían anticuerpos contra esta proteína (Affranchino y col 1989).

Recientemente, la proteína original fue totalmente secuenciada y un análisis posterior mostró que tiene un dominio N-terminal con actividad de neuraminidasa más una zona similar a los módulos de tipo III de fibronectina y un dominio C-terminal antigénico (Pollevick y col 1991). Este último, posee un motivo de secuencia repetida, 15 veces, donde la última es solo parcial (Affranchino y col 1989) y una zona de 40 aminoácidos altamente hidrofóbica posiblemente de anclaje a la membrana (Pollevick y col, 1991). La unidad de repetición está compuesta de 12 aminoácidos y los últimos experimentos establecieron que esta es la zona inmunodominante en toda la molécula (Buschiazzo y col 1991).

El fragmento de ADN correspondiente al clon #7 (que incluye la parte C-terminal de toda la proteína), tiene un peso molecular de unos 2.500 pb. El marco abierto de lectura, se inicia desde el extremo 5' del fragmento clonado hasta el nucleótido 772 donde se encuentra la señal de terminación. Este solo corresponde al dominio antigénico (N-terminal) y la zona de anclaje (C-terminal).

2.5.5.1- EL SAPA COMO CANDIDATO PARA UNA VACUNA

Se ha sugerido que *T.cruzi* puede tener mecanismos genéticos involucrados en la variación antigénica (Peterson y col, 1989). De ser así, los antígenos que han sido descubiertos no tendrían mucha capacidad de ser usados para una vacuna

Para saber si diferentes proteínas son antigénicas en diferentes periodos de infección, se realizaron experimentos comparando la especificidad de anticuerpos presentes en sueros de ratones infectados con los antígenos expresados por los parásitos colectados directamente de la sangre. Cuando éstos fueron tomados en el pico de parasitemia aguda, se observó la expresión del antígeno SAPA (también el #1 y el #30. que son característicos del periodo crónico). Además se han observado frecuentemente solo anticuerpos anti-SAPA en la infección temprana de los ratones. Estos perduran durante largo tiempo sin considerar la cepa de parásito o ratón. Los resultados indicaron que un mismo parásito es capaz de expresar los tres antígenos simultáneamente (para mayor información ver Leguizamón y col, 1990). Por lo tanto, no hay evidencias de que haya variación antigénica para esta proteína la que ocasionaría diferencias en la respuesta inmune durante la fase aguda y crónica. Es importante mencionar que la ausencia de anticuerpos contra los otros antígenos en el modelo murino, no se debió a una carencia de los correspondientes antígenos en el parásito lo que implica la inmunodominancia del SAPA en la composición antigénica del parásito.

Otros experimentos que involucran el estudio a largo plazo en pacientes resistentes a la quimioterapia, no indicaron un variación sistemática en la respuesta inmune (Frasch y col 1990).

Por otro lado, los exoantígenos de algunos parásitos están involucrados en la génesis de la enfermedad. Este es el caso postulado para enfermedades como la malaria (Playfair y col, 1990). Desde este punto de vista, sería posible que el bloqueo de exoantígenos resultase en una vacuna que impida la enfermedad. Los sueros de los pacientes chagásicos agudos definen dos grupos principales de exoantígenos: El primer grupo lo constituyen proteínas de peso molecular aparente 40-50 KDa detectada por sueros de pacientes agudos y de conejos infectados en etapa aguda (Yoshida y col 1989) y un exoantígeno mayor de 160 KDa, detectado sistemáticamente en por sueros de pacientes crónicos (Krettli y Brener, 1982). El segundo grupo lo componen proteínas de 160-200 KDa que corresponden al SAPA.

3 - I N T R O D U C C I O N : 2 a P A R T E

3.1 - EXPRESION, RECUPERACION Y PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES COMO FUSIONES A APENDICES DE AFINIDAD

Durante estos últimos años, se ha desarrollado una gran variedad de sistemas de fusión para la expresión y purificación de proteínas recombinantes, tanto en bacterias como en células eucariontes. En bacterias, estos se componen, básicamente, de un vector que lleva un gen de resistencia a un antibiótico, un origen de replicación para el mantenimiento del replicón, y un gen o parte de él que codifica una proteína con capacidad de unirse a un ligando específico; ésta es llamada apéndice o cola de afinidad (AH) cuya expresión puede ser constitutiva o inducible. En el extremo 3' de este, antes de la señal de terminación existe un sitio de clonado múltiple (MCS), construido por técnicas de ingeniería genética, en el cual hay varios sitios únicos para enzimas de restricción. Si un fragmento clonado a partir de una biblioteca de expresión (usando, por ejemplo lambda gt11) es subclonado en alguno de estos sitios y si el marco abierto de lectura de la AH se continúa con el del fragmento, la resultante es una proteína de fusión en donde generalmente la AH pertenece a la mitad N-terminal y la proteína correspondiente al fragmento subclonado, a la mitad C-terminal llamada proteína blanco (TP). El fusato puede tener distintos destinos, como ser, citoplasmático, periplasmático o extracelular dependiendo de las señales de la AH y del tipo

de células en las que se realiza la expresión. La elección de cada uno de estos destinos dependerá de las exigencias y de los resultados que se obtengan. La proteína quimérica es fácilmente recuperada y purificada, en un solo paso por un pasaje a través de una columna de cromatografía de afinidad, para la AH, a partir de extractos celulares que contienen dicha proteína o del medio de cultivo ya fermentado (Sherwood, 1991). Las AH₂ también son usadas a fin de mejorar la estabilidad de la TP durante la expresión impidiendo, de alguna forma, la degradación proteolítica (Ford y col 1991).

3.2 - TIPOS DE APENDICES DE AFINIDAD

Se han descrito una gran variedad de AH₂ respecto a tamaño y afinidad. Estas incluyen enzimas con afinidad para sustratos e inhibidores; proteínas que unen carbohidratos o dominios de estas; dominios que unen biotina; epítopes con afinidad a anticuerpos policlonales; oligopeptidos cargados para el uso de resinas de intercambio iónico; residuos de polihistidina para cromatografía de afinidad de metales inmobilizados y proteínas que se unen a péptidos.

3.2.1 - ENZIMAS

La enzima beta-galactosidasa (beta-gal) de *E. coli* ha sido extensivamente usada en la expresión intracelular de proteínas. (Germino & Bastia, 1984; Ullmann, 1984; Offensperger y col 1985; Struck y col, 1985; Hírel y col, 1988; Nielsen y col, 1988). Uno de los vectores más versátiles es el pMSgt11

(Scherf y col,1990). La fusión a beta-gal mostró en muchos casos proteger a la TP de la degradación proteolítica (Itakura y col,1977; Goeddel y col, 1979; Shine y col,1980; Stanley y col,1984). Esta es recuperada y purificada por afinidad a análogos de sustratos (Ullmann y col, 1984; Steers y col,1971) o por inmunoafinidad (Shuman y col, 1980; Harris y col,1983; Hanada y col 1988). A veces el producto es insoluble, formando cuerpos de inclusión, debiendo ser tratados con detergentes o agentes caotrópicos para realizar la purificación por cromatografía de afinidad.

El dominio de unión al glutatión de la glutation-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* es otro ejemplo de AH para la expresión intracelular de proteínas en *E.coli*. Se han construido una serie de vectores llamados pGEX (Smith & Johnson ,1988) los cuales tienen el gen de la GST bajo el control del promotor *tac* (De Boer y col, 1983) y el gen *Jac I^a* lo que permite una alta expresión del represor del operón *Jac*, lográndose la inducción por IPTG. La fusión puede ser purificada por afinidad a glutatión inmovilizada a Sepharosa y luego eluida con glutatión reducido, bajo condiciones no desnaturalizantes.

La enzima cloramfenicolacetiltransferasa también es usada como AH para la expresión intracelular de proteínas en *E.coli*. La purificación es lograda por afinidad al sustrato (cloramfenicol) inmovilizado a la matriz inerte (Dykes y col,1988; Knott y col,1988).

Proteínas fusionadas al producto del gen *TrpE* pueden ser expresadas en forma estable y eficientemente aunque a menudo los productos son insolubles (Yansura y col 1990). La hidrofobicidad que estas fusiones presentaron fue utilizada para su purificación usando HPLC con una columna de fase reversa de C_8 y posterior elución con gradiente de 2-propanol en ácido fórmico. (Hummel y col, 1989).

3.2.2 - DOMINIOS QUE UNEN CARBOHIDRATOS

La proteína periplasmática de *E. coli* que une maltosa (MBP) es otra alternativa para la expresión de proteínas ya sea en forma intracelular o periplasmática (Bedouelle, y col, 1988; Guan y col, 1988; Blondel y col, 1990). El vector diseñado para la fusión, pCG806fX, también llamada pMAL (Maina et al, 1988) tiene el gen de la MBP bajo el control del promotor *lac*, por lo cual su expresión es inducida por IPTG. La fusión es purificada por la unión a amilosa immobilizada y posterior elución con maltosa en condiciones no desnaturalizantes.

Otras proteínas que han sido usadas como AH fueron el dominio de unión al almidón de glucoamilasa de *Aspergillus awamori* (Chen y col 1991) usando amilosa immobilizada para su purificación y posterior elución con maltosa. El dominio de unión a celulosa a partir de celulasas de *Cellulomonas fimi* (Greenwood y col, 1989; Ong y col, 1989a; Ong y col, 1989b) donde la fusión puede ser purificada por adsorción a celulosa

a bajas concentraciones de sal y eluidas con agua o con solución de 8 M guanidina. (Ong y col 1991).

3.2.3 - DOMINIOS DE UNIÓN A BIOTINA

La subunidad 1,3 S de la transcarboxilasa de *Propionibacterium shermanii*, posee un dominio de 75 aminoácidos el cual tiene un sitio sensible a ser biotinilado por el huésped. Las fusiones con este dominio son eficientemente purificadas por unión a avidina o streptavidina las cuales poseen una alta afinidad por la biotina ($K_D = 10^{-6} - 10^{-7}$ M; $K_D = 10^{-15}$ M respectivamente). La proteína es luego eluida en condiciones no desnaturalizantes con buffer conteniendo biotina (Cronan 1990). Muy pocas proteínas son biotiniladas tanto en procariontes como en eucariontes, por lo que este sistema ofrece un alto grado de pureza para este tipo de fusión (Ford y col, 1991).

3.2.4 - EPITOPES ANTIGENICOS

Otra alternativa es la de usar como AH antígenos en los cuales se cuentan con sus respectivos anticuerpos monoclonales. Un ejemplo es el octapéptido extremadamente hidrofílico (Asp-Tir-Lis-Asp-Asp-Asn-Asp-Lis) (Hopp y col, 1988), que ha sido usado exitosamente para la purificación en un solo paso de proteínas recombinantes por unión Ca^{2+} -dependiente al anticuerpo inmobilizado dirigido contra el octapéptido (Prickett y col, 1989). La elución se logra disminuyendo la concentración efectiva de Ca^{2+} en el buffer

de la columna. Hopp y sus colaboradores han construido dos vectores de expresión: uno para *E.coli* en el cual se utiliza promotor de una lipoproteína (*lpp^r*) regulado por el operador *lac*, y una señal de secreción de la proteína OmpA fusionada al octapéptido. Otro vector fue construido para la expresión en levaduras con el promotor y la señal de excreción del factor-alfa. En el primer caso la fusión es recuperada en extractos celulares mientras que en el segundo, en el medio de cultivo

3.2.5 - OLIGOPEPTIDOS CARGADOS

Se han construido oligopéptidos cargados positivamente o negativamente, compuestos de múltiples residuos de arginina o ácido aspártico (Smith y col,1984; Sassenfeld y col,1984; Brewer y col,1985) como AH; éstos son muy útiles para la purificación del fusato por cromatografía de intercambio iónico.

3.2.6 - RESIDUOS DE POLIHISTIDINA

La cromatografía de afinidad a metales inmovilizados es una técnica basada en la interacción (por uniones de coordinación) de iones de metales de transición (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} o Co^{2+} ; inmovilizados a la matriz inerte por un agente quelante), con los grupos imidazol o sulfhidrilos de los residuos histidina o cisteína (Porath y col,1975; Hutchens y col,1990). Se han construido vectores donde la AH corresponde a una polihistidina cuya longitud puede ser variable. La

elución se logra disminuyendo el pH de la resina (Hochuli y col 1988)

3.2.7 - FUSIONES CON LA PROTEINA A DE *Staphylococcus aureus*

Dada la importancia de este sistema para el desarrollo de este trabajo de tesis, se lo describirá con mas detalle.

La proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA), se encuentra prácticamente en todas las cepas de esta especie. (Forsgren, 1970) y es uno de los componentes de la pared celular (Sjoquist, y col 1972). Esta tiene la propiedad de unirse a la parte Fc de las inmunoglobulinas de tipo G (IgG) de casi todas las especies de mamíferos (Lindmark y col, 1983), permitiendo que las fusiones a esta protefina sean purificadas por afinidad a IgG inmovilizada, (Nilsson y col, 1985a). Se han construido vectores para expresar las quimeras en *E.coli*, dirigidas al citoplasma (Nilsson y col 1985a; Valerie y col 1987; Monaco y col 1987), al espacio periplasmático (Nilsson y col, 1985a; Abrahmsén y col 1986) o al medio extracelular (Moks y col, 1987a 1987b). En *S.aureus*, en cambio el producto es extracelular encontrándose en el medio de cultivo (Nilsson y col 1985a; Nilsson y col 1985b; Uhlén y col 1984a).

3.2.7.1- LA PROTEINA A COMO APENDICE DE AFINIDAD

La secuencia nucleotídica muestra que la proteína consiste en tres regiones estructural y funcionalmente diferentes (Uhlén y col 1984b). La primera (N-terminal) es la

secuencia señal que consta de 36 aminoácidos muy cargada positivamente en su extremo (punto isoeléctrico: 12) y con una zona altamente hidrofóbica. Esta se cliva durante la traslocación (Abrahamsén y col, 1985), siendo funcional y correctamente procesada no sólo en *S.aureus* sino también en *E.coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces lividans* (Abrahamsén y col 1985; Saunders y col 1984). La segunda región consiste en cinco dominios homólogos de unión a Fc de las IgG (E-D-A-B-C) de 58 aminoácidos. La última región (C-terminal) llamada X, se ancla parcialmente a la membrana citoplasmática y el resto está localizada en la pared celular, donde se une covalentemente al péptido-glicano (Sjodahl J. 1977). En todos los vectores para fusiones a SPA, esta última está deletada.

Muchas características de la SPA hacen que sea, una poderosa herramienta para la expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a ésta:

1) La unión de la SPA a la Fc se da con extremada avidéz ($K_D = 2 \times 10^{-9}$ M para el dominio B. Lindmark y col, 1983) este hecho permite la purificación de la fusión en un solo paso por cromatografía de afinidad con un rendimiento mayor al 95% (Nilsson y col, 1985a).

2) Cada dominio de unión a Fc de IgG consisten en pequeños dominios globulares. Esto facilita su plegado en forma independiente a la proteína que lleva fusionada, minimizando el riesgo de impedimento estérico a la unión con la Fc (Uhlén y col 1984; Moks y col 1986; Deisenhofer y col 1978).

- 3) La SPA es estable frente a la degradación proteolítica no solo en su hospedador homólogo *S.aureus* sino también en citoplasma y en el espacio periplásmico de *E.coli* (Nilsson y col 1985a; Uhlén y col 1983)
- 4) Se han desarrollado sistemas de expresión y secreción de fusiones a SPA en varias especies bacterianas siendo las más útiles *E.coli* y alternativamente *S.aureus* (Nilsson & Abrahmsén, 1990).
- 5) La vida media de los productos de fusión *in vivo*, son a menudo incrementados, especialmente cuando la proteína de interés es básica. Una posible explicación es la interacción de esta última con algún dominio de la SPA (que son ácidos), sin impedir la interacción con la Fc con otro de los dominios, formando agregados solubles protegidos de la acción de las proteasas (Moks y col 1987a y 1987b; Abrahmsén y col 1986; Nilsson y col 1985b).
- 6) Si se trata de obtener anticuerpos contra proteínas débilmente inmunógenas, las fusiones con SPA probaron aumentarla puesto que esta última actúa como un adyuvante (Lowenadler y col, 1986 y 1987; Valerie y col, 1987) dada la capacidad mitogénica que posee la SPA sobre las células B y T (Rodey y col 1972; Sakane y col 1978) y su capacidad de inducir respuesta policlonal (Moraguchi y col, 1980)

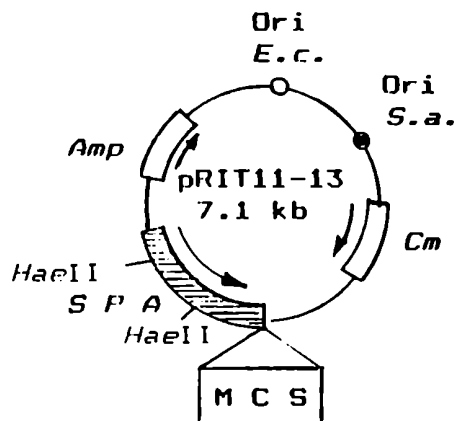
3.2.7.2 - VECTORES PARA LA EXPRESION DE FUSIONES CON LA PROTEINA A

Dos grupos de vectores fueron diseñados para la construcción de quimeras. El primer grupo llamado serie 10 (pRIT11, 12 y 13; figura 1A) (Lowenadler y col, 1986) y sus derivados pertenecientes a la serie pRIT20 (pRIT21, 22 y 23; figura 1B paginas 30 y 31) (Nilsson & Abrahamssén 1990) pueden replicar y seleccionarse tanto en *E.coli* como en *S.aureus* (Lowenadler y col 1986). La parte funcional para *E.coli*, proviene del plásmido pEMBL9 (Dente y col, 1983) y consta del origen de replicación del replicón pMB1 (estrechamente relacionado al ColE1) y un gen de resistencia a la ampicilina proveniente del plásmido R1 con algunos sitios de restricción modificados (Hardy, 1986). La parte funcional para *S.aureus* consta de un origen de replicación y un gen de resistencia al cloramfenicol del plásmido estaficócico pC194 (Horinouchi y col 1982) cuya expresión en los vectores pRIT_n es constitutiva (Nilsson 1985a).

El gen de la SPA posee su promotor original, que es funcional en ambas especies (Löwenadler y col 1986). Su extremo 3' fue modificado respecto al original, este carece del dominio X y en su lugar hay un MCS, por eso tanto la SPA libre como la fusión no se anclan a la membrana sino que el pasaje continúa y tiene como destino final el periplasma (en *E.coli*) o el exterior de la célula (en *S.aureus*).

FIGURA 1A

Esquema general de los vectores pRIT11-12-13. A continuación se detallan los sitios de clonado múltiple de cada uno de ellos y sus correspondientes sitios de proteólisis específica. El signo " ^ " indica el punto de clivado. Las flechas dentro del esquema señalan el sentido de la transcripción. Ori S.a., origen de replicación para *S.aureus*; Ori E.c., origen de replicación para *E.coli*; Cm, gen de resistencia al cloranfenicol; Amp, gen de resistencia a la ampicilina; SPA, proteína A de *S.aureus*; MCS, sitio de clonado múltiple. También se detallan los dos sitios *HaeII* dentro de la SPA.



pRIT11

| | <u>EcoRI</u> | <u>SmaI</u> | <u>BamHI</u> | <u>SaII</u> | <u>PstI</u> |
|---|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| AAG CCT GAT GAC GAT AAG GAA TTC CCG GGG ATC CGT CGA CCT GCA G | | | | | |
| Lis Pro Asp Asp Asp lis Glu Fen Pro Gli Ile Arg Arg Pro Ala | | | | | |
| -----^----- | | | | | |
| <i>Enteropeptidasa</i> | | | | | |

pRIT12

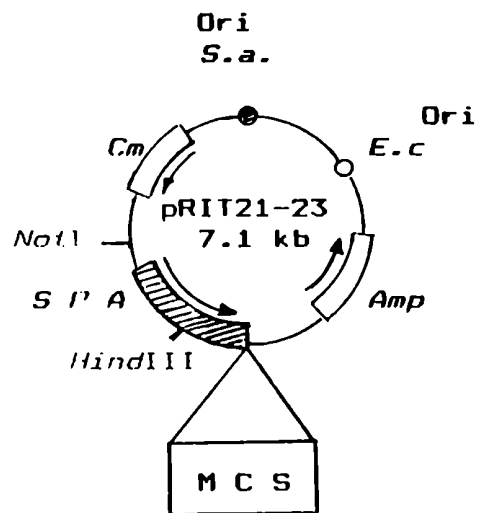
| | <u>EcoRI</u> | <u>SmaI</u> | <u>BamHI</u> | <u>SaII</u> | <u>PstI</u> |
|---|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| AAG CCT GGT GGA CCA GGA ATT CCC GGG GAT CCG TCG ACC TGC AGC | | | | | |
| Lis Pro Gli Gli Pro Gli Ile Pro Gli Asp Pro Ser Thr Cis Ser | | | | | |
| -----^----- | | | | | |
| <i>Colagenasa</i> | | | | | |

pRIT13

| | <u>EcoRI</u> | <u>SmaI</u> | <u>BamHI</u> | <u>SaII</u> | <u>PstI</u> |
|---|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| AAG CCT ATC GAA GGT AGG AAT TCC CGG GGA TCC GTC GAC CTG CAG C | | | | | |
| Lis Pro Ile Glu Gli Arg Asn Ser Arg Gli Ser Val Asp Leu Gln | | | | | |
| -----^----- | | | | | |
| <i>Factor Xa</i> | | | | | |

F I G U R A 1 B

Esquema general de los vectores pRIT21-22-23. A continuación se detallan los sitios de clonado múltiple de cada uno de ellos y sus correspondientes sitios de proteólisis específica. El signo "Λ" indica el punto de clivado. Las flechas dentro del esquema señalan el sentido de la transcripción. Ori S.a., origen de replicación para S.aureus; Ori E.c. origen de replicación para E.coli; Cm gen de resistencia al cloranfenicol; Amp gen de resistencia a la ampicilina; SPA, proteína A de S.aureus; MCS, sitio de clonado múltiple. También se indican los sitios *NotI* y *HindIII*.



Continuación de la FIGURA 1B

pRIT21

EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI

AAG CCT GAT GAC GAT AAG GAA TTC GAG CTC GGT ACC CGG GGA TCC
 Lis pro Asp Asp Asp Lis Glu Fen Glu Leu Gli Thr Arg Gli Ser

-----^
Enteropeptidasa

XbaI SaII PstI SphI

TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA TGC AAG CTA GCT TAA
 Ser Arg Val Asp Leu Gln Ala Cis Lys Leu Ala ***

pRIT22

EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI

AAG CCT GGT GGA CCA GGA ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGG ATC CTC
 Lis Pro Gli Gli Pro Gli Ile Arg Ala Arg Tir Pro Gli Ile Leu

-----^
Colagenasa

XbaI SaII PstI SphI

TAG A G T C G A C C T G C A G G C A T G C A A

pRIT23

EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI

AAG CCT ATC GAA GGT AGG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT
 Lis Pro Ile Glu Gli Arg Asn Ser Ser Ser Val Pro Gli Asp Pro

-----^
Factor Xa

XbaI SaII PstI SphI

CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TAG C T T A A
 Leu Glu Ser Thr Cis Arg His Ala Ser ***

En el pRIT11 y 21, la secuencia de reconocimiento para la enzima *EcoRI* deja el mismo marco de lectura del fago lambda-gt11, en el 12 y 22 esta corrida en un nucleótido mientras que en el 13 y 23 el corrimiento es en dos nucleótidos (Lownadler y col 1986). De forma tal de tener representado en los sitios de clonado los tres marcos de lectura posibles.

El segundo grupo lo constituyen los vectores de la serie pRIT30 (31,32 y 33) (Nilsson & Abrahmsén 1990) y su precursor pRIT2 (Nilsson y col 1985a). Estos carecen de la señal de transporte hacia el exterior, solo pueden mantenerse en *E.coli* dando como resultado la localización citoplasmática del fusato. El promotor natural de la SPA es reemplazado por el promotor del operón derecho del fago lambda, P_{λ} (Zabeau & Stanley, 1982), así, en hospedadores que expresan el represor cI_{ts} (termosensible) el sistema es inducible a través de un shock a 42 °C. De modo igual a la serie 20 y sus precursores, en la serie 30, estan representados los tres marcos de lectura dentro del MCS, 3' del gen de la SPA, siendo la 31 igual a la 11 y 21; la 32 igual a la 12 y 22; y la 33 igual a la 13 y 23.

Las series 20 y 30 poseen ciertos adelantos respecto a sus precursores (Nilsson & Abrahmsén 1990), los que se detallan a continuación (ver figura 1B).

1) La expresión, de la SPA se da en niveles mas altos.

- 2) El MCS está basado en el mp18 y no como en los precursores los que se basan en el mp8. Este cambio incrementa el número de sitios de clonado en el extremo 3' de la SPA.
- 3) Un sitio sintético de terminación de la transcripción fue incluido a unas pocas bases "rioabajo" del MCS.
- 4) Las señales de terminación de la traducción fueron incluidas inmediatamente después del MCS (TAA) y en todos los marcos de lectura. Esto es importante para los fragmentos subclonados que son un marco abierto de lectura porque asegura el fin de la síntesis cercano al extremo 3' del inserto.
- 5) Un sitio *NotI* fue creado 5' del promotor con el fin de facilitar el subclonado de toda la fusión a otro vector.
- 6) Un promotor *lacUV5* (Deuschle y col 1986) está ubicado "rioarriba" del promotor propio de la SPA, este tiene un efecto limitado en la serie 20 en la inducción por IPTG (Nilsson & Abrahmsén 1990). En la serie 30 el promotor *lacUV5*, puede ser útil para obtener una débil inducción en la producción de la fusión si una sobreproducción implica la formación de cuerpos refractarios. Este "doble promotor alineado" puede ser usado para obtener tres niveles distintos de expresión: 1) el estado reprimido; 2) inducido con IPTG y 3) Inducido a través del promotor P_{λ} por el cambio de temperatura en hospedadores *E.coli* *cl₈*. La inducción simultanea no fue distinta a la inducción por cambio de temperatura (Nilsson & Abrahmsén 1990).

3.2.7.3 - ELECCION DEL VECTOR Y EL HOSPEDADOR

La elección del vector dependerá del origen y propiedades de la proteína a expresar. En el caso de proteínas que se exportan, son a menudo degradadas en el citoplasma bacteriano por las proteasas del huésped o precipitan formando cuerpos refractarios en la matriz celular (Schoemaker y col 1985). En este caso, la serie pRIT20 es particularmente recomendada. En cambio, proteínas que son encontradas en el citoplasma o en compartimientos de membrana en la célula original, pueden ser incompatibles con la traslocación a través de la membrana bacteriana y deberían ser expresadas en la serie pRIT30 (Nilsson & Abrahmsén, 1990).

Existen varias ventajas para el uso de *S.aureus* como hospedador:

- 1) Los vectores en esta bacteria, son mantenidos en forma estable sin la presión de selección (Nilsson & Abrahmsén, 1990).
- 2) Las fusiones a SPA son liberadas al exterior eliminando el problema de la ruptura celular que se requiere para extraer y purificar la proteína producida.
- 3) La concentración de proteasas extracelulares son mucho mas bajas que las del citoplasma de *E.coli* y en cultivos de otras bacterias gram-positivas como *Bacillus sp* o *Streptomyces sp* (Nilsson & Abrahmsén, 1990).

No obstante, siendo *S.aureus* un patógeno oportunista, sería preferible usar especies alternativas no patógenas como

Staphylococcus xylosus o *Staphylococcus carnosus* (Uhlén y col 1984).

3.2.7.4 - RECUPERACION DE LA PROTEINA SIN EL APENDICE DE AFINIDAD

Cuando se desea obtener la proteína libre de la AH, la fusión debe clivarse en el punto de unión entre ambas mitades. Una vez lograda esta ruptura, un segundo pasaje a través de la columna de afinidad deja purificada la proteína, quedando retenida la AH y la fusión que no ha sido procesada.

Básicamente, existen dos clases de metodologías para lograr un clivado eficiente: un tratamiento químico o un tratamiento enzimático. La elección dependerá de la estructura de la proteína de interés, entre otros factores, el tener un único sitio blanco de proteólisis.

Algunos ejemplos de tratamiento químico son: con bromuro de cianógeno donde el sitio de clivado se encuentra donde hay una metionina (Gross & Witkop, 1962); con hidroxilamina a pH 9 en donde el sitio de corte es asparagina-glicina (Bronstein & Balian, 1977) o ácido fórmico para asparagina-prolina (Pisziewicz y col, 1970). Evidentemente, este tipo de tratamiento es ventajoso respecto a las consideraciones técnicas y económicas, pero poseen un especificidad limitada y requieren la ausencia de los aminoácidos blanco dentro de la proteína de interés.

El tratamiento enzimático tiene la ventaja de presentar alta especificidad, puesto que los sitios de reconocimiento

son de varios aminoácidos (y la probabilidad de que se den dentro de la proteína de interés es relativamente baja). Aunque en muchas preparaciones (sobre todo comerciales), la presencia de actividades proteolíticas extras, complica el tratamiento (Ford y col, 1990), muchos autores las han usado exitosamente (ver mas abajo).

Los vectores de la serie 20 y la serie 30, junto con sus precursores, fueron diseñados de forma tal que en el punto de separación de ambas mitades en la fusión, se encuentre el sitio de reconocimiento y clivado de la enteropeptidasa [(Asp)₃-Lis-] en el pRIT21 y 11; colagenasa [ProX-GliPro] en el pRIT22 y 12; y el factor de coagulación X activado (Xa) [IleGluGliArg-] en el pRIT23 y 13 (Lowenadler y col, 1986; Nilsson & Abrahmsén, 1990). En el primer y tercer caso, la proteólisis específica deja el auténtico C-terminal en la proteína de interés, cuando el fragmento de ADN se ha subclonado en el sitio *EcoR* (ver figura 1).

La enteropeptidasa (enteroquinasa) es el activador fisiológico del tripsinógeno, el cual, es clivado específicamente para dar tripsina en la luz del duodeno (Light & Janska, 1989). Las preparaciones comerciales (Sigma, USA) contienen pequeñas cantidades de tripsina ya que la fuente natural es el intestino delgado de porcinos o bovinos. Este hecho puede traer algunos inconvenientes (ver sección resultados). El problema, ha sido resuelto por Hopp (Hopp y col, 1988), empleando esta enzima de intestino delgado de bovino y purificada por cromatografía de afinidad logrando

una actividad específica = 280.000 Unidades/mg (*) (Liepnieks & Light, 1979).

La colagenasa fue también ensayada en forma eficiente (Hanada y col, 1988) así como también el factor Xa (Nagai & Thogersen, 1987; Maina y col, 1988) y la trombina (Hummel y col 1989).

Pese a todos los adelantos que se han hecho en el campo de la expresión de proteínas fusionadas, el clivado específico continúa siendo un problema, sobretodo para la producción de proteínas de uso farmacológico (Ford y col, 1991). Muchas veces, la eliminación de la AH no es necesaria, haciendo ideal este tipo de sistema por la eficiencia en la expresión, rapidez y facilidad en la purificación..

* Una unidad de enteropeptidasa es la cantidad de enzima necesaria para activar 0,065 mg de tripsinógeno, a 5°C durante 1 hora a pH 5,8. (Kunitz, 1939).

4 - O B J E T I V O S

Sobre la base de los antecedentes presentados en la introducción, se fijaron para la presentación de este trabajo de tesis, los siguientes objetivos.

4.1 - ESTUDIO DE UN SISTEMA DE EXPRESION EFICIENTE PARA CUATRO ANTIGENOS DE *T.cruzi*.

Dada la importancia de obtener antígenos purificados y en cantidades suficientes para el diagnóstico o el desarrollo de una vacuna, se ha estudiado la forma de producirlos eficientemente, utilizando vectores de expresión que rindan fusiones con la SPA como apéndice de afinidad, por las ventajas ya mencionadas (ver sección 3.2.7.1).

De la colección de antígenos clonados previamente (ver sección 2.5), se ha elegido el 1 como modelo inicial para demostrar si este sistema era válido. A partir de los resultados, se continuó con los fragmentos de ADN de los restantes antígenos.

La expresión de la proteína fusión, fue evaluada en dos hospedadores: *E.coli* y *S.aureus*. Una vez establecida, se procedió a estudiar la forma de recuperar y purificar la proteína fusión, producida en ambas bacterias a fin de elegir el hospedador mas conveniente en función de la practicidad, los niveles de proteína sintetizada y la degradación.

Esta última, fue estudiada con mas detalle en algunos casos puesto que tratándose de un sistema de fusión, la

ruptura ocasionada por las proteasas del hospedador, pudo implicar una disminución en el rendimiento de la proteína al final de todo el proceso. Con tal motivo se estudió, para cada proteína en particular, el método que implique una mínima hidrólisis durante la fermentación, haciendo modificaciones ya sea en las condiciones de cultivo como a nivel génico (esto es: la modificación de un sitio dentro del fusato reconocido por una proteasa de la bacteria).

Una vez purificado el fusato se procedió a estandarizar las condiciones de proteólisis específica, a fin de separar ambas mitades, empleando el método enzimático y la ulterior purificación para eliminar la mitad SPA y los restos de proteína fusión no clivados, evaluando la cantidad de antígeno auténtico (o antígeno libre de SPA) por unidad de volumen de cultivo.

4.2 - FUSION GENICA DE ANTIGENOS DISTINTOS

Puesto que la metodología empleada para cada antígeno en particular, aún implicaría un trabajo tedioso, se estudió la posibilidad, de simplificarlo a través de construcciones en la que dos y tres genes se fusionaron para producir una única proteína que conserve la misma capacidad de reaccionar con antisueros de pacientes como lo hacen cada uno de ellos por separado. Se han evaluado distintos tipos de fusiones con respecto a su estabilidad en la quimera (esto es: SPA-Ag₁-Ag₂-...). La idea fue aproximarse a la obtención de una poliproteína única que represente a todos los antígenos a

disposición (ver sección 2.5) de forma tal de expresar
recuperar purificar todo el "repertorio" en un solo
procedimiento.

5 - MATERIALES Y METODOS

5.1-ANALISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS Y AMINOACIDICAS

Con el fin de obtener la mayor información respecto a los fragmentos de ADN, y sus correspondientes proteínas; las secuencias nucleotídicas (*) (Ibañez y col 1988; Affranchino y co, 1989) fueron estudiadas usando el programa de análisis de secuencia Pustell, versión 4 (International Biotechnologies, Inc. New Haven, Connecticut). Estas fueron introducidas, a través del programa, al disco rígido de la computadora y se les determinó los sitios de restricción de cada fragmento de ADN. Las secuencias fueron traducidas a sus correspondientes péptidos, los que fueron almacenados, determinando entre otros parámetros, el peso molecular, punto isoeléctrico estimado, el perfil de hidropatía y la presencia de las secuencias de corte para la enteropeptidasa y el factor Xa.

La hidropatía fue determinada en base a los trabajos de Kyte y Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Brevemente, el programa otorga a cada aminoácido y en forma secuencial, un valor de energía libre (calculado a partir de coeficientes de partición para sistemas de dos fases por ejemplo agua-solvente orgánico) cuando se encuentra como resto libre. Esta determinación secuencial se realizó en grupos de, por ejemplo, 9 aminoácidos (segmento o ventana = 9), los promedia y ese valor le es asignado al aminoácido del medio (esto es al N° 5 para el primer segmento o ventana). Luego sigue con

el segundo segmento el cual es definido por el corrimiento de un aminoácido en la secuencia (del 2 al 10) y repite la misma operación dándole el valor al N° 6. Una vez recorrida toda la secuencia, vuelve a hacer lo mismo con los valores ya asignados obteniendo un promedio pesado. A partir de esto, puede obtenerse un gráfico con estos valores en función de cada aminoácido de la proteína en forma secuencial. Puesto que cada residuo tiene un valor determinado en función de los que están en las "vecindades", el gráfico definió zonas de hidrofiliidad e hidrofobicidad. Inicialmente, los resultados obtenidos de esta manera, fueron comparados con varias proteínas de estructura conocida a través de estudios cristalográficos, demostrando una correlación entre las zonas hidrofílicas y las que están mas expuestas en la molécula; y las que son hidrofóbicas con las que estan escondidas. Luego de realizar este tipo de comparación con distintos valores de "ventana", el correspondiente a 9 aminoácidos dió la mejor correlación. Esto no necesariamente coincide, ya que estos resultados se refirieron a proteínas globulares.

En un gran número de casos, las zonas hidrofílicas acompañan a las antigénicas (Hopp & Woods 1981; Welling y col 1985), aunque algunos resultados indicaron que no necesariamente es así (Geysen y col 1987).

5.2 - SUBCLONADO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN EN LOS VECTORES DE EXPRESION

5.2.1-ENZIMAS

Las enzimas de restricción y modificación (ligasa y exonucleasas), fueron empleadas según los protocolos recomendados por el proveedor (BRL; USA).

5.2.2-PREPARACION DE PLASMIDOS Y FRAGMENTOS DE ADN

Los plásmidos fueron amplificados en *E.coli* HB101, las que fueron crecidas en caldo L (triptona 1%, extracto de levadura 5%, cloruro de sodio 1%) suplementado con ampicilina 100ug/ml toda la noche a 37 °C con agitación continua. La extracción fue realizada según la técnica de Birnboim-Doly (Birnboim and Doly, 1979). Para extracciones preparativas y analíticas se utilizaron 100 ml y 1,5 ml de cultivo respectivamente.

En el caso de *S.aureus*, las cepas fueron cultivadas en caldo L suplementado con cloramfenicol 20 ug/ml. Una vez centrifugadas, las células fueron lisadas con lisostafina 0,12 mg/ml en búffer NET (Tris-ClH 20 mM pH 7,0; ClNa 100 mM) durante 30 minutos a 37 °C y luego se procedió de igual forma que en *E.coli*. En todos los casos ADN plasmídico fue purificado con fenol-cloroformo y precipitado con isopropanol como se describe (Sambrook y col, 1989). En todos los casos el ADN fue resuspendido en búffer TE (Tris-ClH 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM).

Para la purificación de fragmentos de ADN libres de vector (*), se ha digerido masa de aproximadamente 40 ug de plásmido recombinante con 100 unidades de la enzima de restricción adecuada. Los productos de digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% y los fragmentos de peso molecular esperado fueron electroeluidos a partir del gel según las técnicas establecidas (Sambrook y col, 1989). Los fragmentos purificados según este método fueron usados ya sea en el subclonado o para otros procedimientos.

A menos que esté indicado, los plásmidos y fragmentos de ADN, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa cuyo poro fue determinado según su peso molecular. Las condiciones de corrida fueron ajustadas como se describe (Sambrook y col, 1989) así como también la tinción y fotografía de los geles. La determinación de los pesos moleculares fue hecha usando patrones ADN de fago lambda digerido con *HindIII*, ADN de fago Fix₁₇₄ digerido con *HaeIII* o 1 Kb Ladder (BRL, USA).

5.2.3 - INSERCIÓN DE LOS FRAGMENTOS EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN

Los vectores (figura 1, pag 29-31), fueron preparados según la metodología descrita, linearizados con la enzima de restricción adecuada, repurificados con fenol-cloroformo y precipitados con medio volumen de acetato de amonio 7.5 M; pH 7,5 y dos volúmenes de etanol (Sambrook y col, 1989).

500 ng de vector fue ligado con una masa de fragmento a fin de lograr una relación molar vector/inserto = 1/4; usando ligasa de fago T4 de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (BRL, USA). La mitad de esta mezcla de ligación, fue analizada por electroforesis en gel de agarosa con el fin de controlar la positividad de la reacción y un cuarto del volumen inicial fue usado para transformar *E.coli* DH5-alfa y *E.coli* HB101 según el método de Hanaham (Hanaham, 1983). Las células transformadas fueron seleccionadas en medio sólido L (caldo L, agar 1,2 %) suplementado con ampicilina (100 ug/ml) y crecidas toda la noche a 37 °C.

En primera instancia, se realizó un estudio del contenido plasmídico de varios clones resistentes a la ampicilina seleccionados al azar. Por análisis de electroforesis en gel de agarosa 0,6%, Se han elegido los plásmidos que presentaron un mayor peso molecular respecto al vector. Estos fueron analizados por digestión con las enzimas correspondientes a cada caso, para comprobar la presencia del inserto en el vector. Se efectuó un segundo control por digestión con *SaII* y electroforesis en gel de agarosa 0,5% (ya que en todos los casos, los fragmentos carecen de sitios para esta enzima y por lo tanto se logra un solo corte en todos los plásmidos), con el fin de establecer cuantos fragmentos fueron ligados al vector.

5.3 TRANSFORMACION EN *S.aureus*

En el trabajo de rutina, una vez lograda la construcción deseada usando como hospedador *E.coli*, se procedió a transformar *S.aureus* con el plásmido recombinante.

La transformación en esta especie, fue lograda siguiendo dos protocolos distintos al de Hanaham. El primer procedimiento se basó en la metodología de Chang (Chang & Cohen, 1979) modificada como se detalla a continuación:

A) Preparación de protoplastos

Todo el material de vidrio fue libre de detergente así como también las soluciones y los medios, los que se detallan a continuación del protocolo:

- 1) La cepa de *S.aureus* SA113 fue crecida en caldo L durante toda la noche.
- 2) 0,1 ml de este inóculo se agregó a 20 ml de caldo B e incubándolas a 37 °C con agitación continua hasta una densidad óptica, a 600 nm de longitud de onda (DO_{600}), de 1,2.
- 3) Las células fueron cosechadas por centrifugación a 8000 x g durante 15 minutos a 4 °C.
- 4) Luego de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 20 ml de SMMP y fueron transferidas a un erlenmeyer de 100 ml.
- 5) Se agregó 0,3 ml de solución de lisostafina (BRL, USA) 1 mg/ml y 0,75 ml de lisozima (BRL, USA) 40 mg/ml. La suspensión fue incubada a 37 °C con agitación suave.

6) La formación de protoplastos fue seguida por disminución de la DO_{600} hasta que la absorbancia decreció a un 30-35%.

7) Las células sin atacar fueron eliminadas por centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos y los protoplastos presentes en el sobrenadante, fueron centrifugados a 7000 x g durante 25 minutos a temperatura ambiente y resuspendidos en 2 ml de SMMP.

B) Transformación de los protoplastos

Se mezclaron en un tubo de centrifuga de 15 ml:

- 1) 0,3 ml de suspensión de protoplastos.
- 2) 500 ng de ADN plasmídico disueltos en TE.
- 3) 2 ml de fusógeno (polietilenglicol 50% en SMM 1x).

Luego de mezclar cuidadosamente, se agregó 7 ml SMMP mezclando por inversión. Los protoplastos fueron centrifugados a 7000 x g durante 25 minutos a temperatura ambiente y resuspendidos en 0,4 ml de SMMP.

C) Expresión fenotípica

Después de sembrar todo el volumen de la suspensión de protoplastos transformados en medio sólido de recuperación DM-3 (30 ml por placa), se incubaron a 37 °C durante 3,5 horas, con el fin de dar tiempo a la síntesis de la enzima cloranfenicolacetiltransferasa codificada por el plásmido.

D) Selección de transformantes

1) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se cubrieron con "agar blando" suplementado con un volumen de cloranfenicol 10 mg/ml de forma tal de llevar el cultivo en

medio sólido a una concentración final de 10 ug/ml (ver apéndice).

2) Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas y los clones resistentes fueron analizados según su contenido plasmídico, por el método ya descrito (ver sección 4.2.2).

Es importante aclarar que todo el trabajo lleva un tiempo de 14 horas.

5.3.1 - MEDIOS Y REACTIVOS PARA LA TRANSFORMACION DE *S.aureus* (Chang & Cohen, 1979)

Caldo B

Peptona1%
 Extracto de levadura.....0,5%
 Glucosa0,1%
 Cloruro de sodio0,5%
 Fosfato di básico de potasio x 2 H₂O.....0,1%

Se ajustó el pH a 7,5 con ClH y se esterilizó por autoclave durante 15 minutos a 121 °C. La glucosa fue preparada aparte, esterilizada por filtración y agregada al caldo en el momento de usar.

S M M 2 X

Sacarosa1 M
 Acido maleico0,04 M
 Cloruro de magnesio0,04 M

Se ajustó el pH a 6,5 con NaOH y se esterilizó por filtración

P A B 4 X

Medio para Antibiótico Nº 3 (Difco, USA), 7 %

Se ajustó el pH a 7,4 con NaOH y se esterilizó por autoclave 15 minutos a 121 °C.

S M M P (Medio para la formación de protoplastos)

SMM 2 X55 ml

PAB 4 X40 ml

Albúmina Sérica Bovina 5%5 ml

La solución de albúmina sérica bovina (fracción V) fue ajustada a pH 7,5 con NaOH y esterilizada por filtración.

Este medio fue preparado al momento de ser usado.

Fusógeno

Polietilenglicol (8.000)40 g

SMM 2X50 ml

Agua destilada20 ml

Se esterilizó en autoclave a vapor fluente durante 30 minutos

Medio sólido DM-3 para la regeneración de protoplastos

| | |
|--|--------|
| Agar 5% | 200 ml |
| Succinato de sodio 1 M..... | 500 ml |
| Hidrolisado de caseína 5 %..... | 100 ml |
| Extracto de levadura 5 %..... | 60 ml |
| K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 3,5% / 1,5% | 100 ml |
| Glucosa 50 % | 10 ml |
| Cloruro de magnesio 1 M | 20 ml |
| Albúmina sérica bovina 5 % | 10 ml |

La solución de succinato de sodio 1M fue ajustada a pH 7,3 con ácido succínico 1M.

Los componentes individuales fueron esterilizados por autoclave durante 15 minutos a 121 °C salvo la glucosa y la albúmina sérica bovina las que fueron esterilizadas por filtración.

Cada placa contuvo 30 ml de medio de recuperación.

C Y - 3

| | |
|---|--------|
| Hidrolisado de caseína..... | 10 g |
| Extracto de levadura | 10 g |
| Cloruro de sodio | 6 g |
| Agar | 4 g |
| Agua destilada (cantidad suficiente para).. | 400 ml |

El medio se fraccionó en alícuotas de 25 ml y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Suplemento

Cloruro de magnesio 1M10 ml

Glucosa 5 %5 ml

Fosfato de Na-beta-glicerol 48,6 %20 ml

Albúmina sérica bovina 5 %5 ml

Todos los componentes fueron preparados por separado y esterilizados por autoclave durante 15 minutos a 121 °C salvo la albúmina sérica bovina la que fue esterilizada por filtración.

Agar blando para la selección de transformantes

CY-3 fundido y estabilizado a 50 °C.....25 ml

Succinato de sodio 1 M estabilizado a 50 °C....25 ml

Suplemento4 ml

Antibiótico: ver la tabla que se muestra a continuación

Antibióticos para la selección de transformantes

| Antibiótico | Solución de Stock (mg/ml) | ml en 50 ml de Agar blando | Concentración final (ug/ml) |
|---------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Cloramfenicol | 10 | 0,5 | 10 |
| Eritromicina | 10 | 1 | 20 |
| Kanamicina | 100 | 2,5 | 500 |
| Tetraciclina | 25 | 0,5 | 25 |

La electroporación fue el procedimiento alternativo para la transformación de *S.aureus*. En este caso la cepa empleada fue RN4220 (Kreiswirth y col, 1983) puesto que la cepa SA113 mostró ser incompetente para este método. El método se basa en someter a las células, a un campo eléctrico de alta magnitud en tiempos equivalentes a milisegundos. Este proceso produce poros transientes en la membrana de la célula, posiblemente por una momentánea inversión en la polaridad de la célula. A través de estos poros, el plásmido puede entrar pero no salir a causa de la naturaleza transitoria de estos. (Powell y col, 1988). El aparato usado fue el "Gene-Pulser" de BioRad y las condiciones para cepa RN4220, fueron las siguientes: una fuerza de campo eléctrico de 2,5 KV con un capacitor interno de 25 uF y una resistencia de 100 Oms y el tiempo se ajustó automáticamente a 2,5 miliseg (Rhoads Kraemer & Iandolo, 1990). La cubeta empleada fue de 0,2 cm (distancia entre los electrodos).

El procedimiento usado en este trabajo, también fue de acuerdo a los ensayos de Rhoads Kraemer y Iandolo (Rhoads Kraemer & Iandolo, 1990) el cual básicamente consistió en lo siguiente:

- 1) Un inóculo de 1ml a partir de un cultivo crecido en caldo Tripticasa-soja durante toda la noche, fue introducido a 50 ml del mismo caldo e incubado a 37 °C con agitación continua hasta que alcanzó una DO_{600} de 0,3-0,8.
- 2) Las células fueron cosechadas por centrifugación a 8000 x g y luego de eliminar el sobrenadante, fueron resuspendidas

en solución de sacarosa 0,5 M sin electrolitos en un igual volumen.

3) Se repitió la misma operación que en (2) con la diferencia de que las células fueron resuspendidas en 0,5 volúmenes con la misma solución de sacarosa y dejadas en hielo durante 15-30 minutos.

4) La suspensión fue fraccionada en alícuotas de 400 μ l, congeladas con nitrógeno líquido y guardadas a -70°C

5) Luego de descongelar las células a temperatura ambiente, se colocaron 40 μ l de la suspensión y 1 μ l conteniendo 100 ng de ADN plasmídico.

6) Luego de un pulso de campo eléctrico en las condiciones ya descritas, las células fueron diluidas con 1 ml de SMMP mezclando por inversión.

7) De esta última suspensión se sembró 0,2 ml en medio L sólido suplementado con cloranfenicol 10 $\mu\text{g/ml}$.

8) Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Es importante recalcar que el tiempo empleado en todo el procedimiento fue de aproximadamente 1 hora.

5.4 - EXPRESION DE LOS ANTIGENOS FUSIONADOS A SPA

EN *E.coli* y *S.aureus*

La expresión fue demostrada empleando el ensayo de inmunoprecipitación en gel, rastreo inmunológico de colonias. y análisis por Dot blot.

5.4.1 - INMUNOPRECIPITACION EN GEL

La reacción de inmunoprecipitación por doble difusión en gel de agarosa (Ouchterlony, 1958) fue empleada en primera instancia. Se partió de cultivos jóvenes (6 horas) en medio líquido de Tripticasa-Soya con un inóculo inicial 1/100. 3 ml de cultivo fue centrifugado, las células fueron resuspendidas en PBS (fosfato de sodio 20 mM pH 7,4, NaCl 0,85%) y sonicadas durante un tiempo de 2 a 4 segundos a la frecuencia máxima. Los restos celulares fueron eliminados por ulterior centrifugación y la concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). 10 ug de proteína total de cada extracto fue sembrado en pocillos separados dispuestos en forma circular en una placa de gel de agarosa 1% en PBS. Paralelamente fue estudiada la presencia de la fusión en el medio de cultivo fermentado por siembra de 50 ul del sobrenadante de las células centrifugadas. El pocillo central fue sembrado con 10 ul de antisuero hecho en conejo (*). Luego de una incubación de toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda, el gel fue secado, teñido con azul de Coomasie y lavado con solución decolorante (metanol 40%, ácido acético 10% en agua).

La expresión de SPA ya sea libre o fusionada, fue determinada también por este método, con la diferencia de que en el pocillo central se sembró 10 ul de IgG humana (IgG-H) purificada 10 ug/ul.

5.4.2 - RASTREO INMUNOLOGICO DE COLONIAS

Como ensayo previo, se realizó una réplica de placa de clones que presentaron positividad y negatividad en el ensayo de inmunoprecipitación en gel. El rastreo inmunológico fue modificado respecto al originalmente descrito (Helfman y col, 1984). Brevemente, las colonias de una placa fueron transferidas a filtro de nitrocelulosa y sometidas a vapores de cloroformo en cámara cerrada durante 30 minutos a temperatura ambiente. El filtro fue tratado toda la noche con *lisozima* 2 mg/ml y *DNAseI* 1ug/ml en albúmina bovina 3% (Sigma, USA); Tris-ClH 50 mM pH 7.5; Cl₂Mg 20 mM. Los filtros fueron lavados 2 veces con la misma solución sin los tres primeros componentes y bloqueados con gelatina 3% (Sigma. USA) en TBS (Tris-ClH 50 mM; ClNa 150 mM) durante 1 hora.

En el caso de detectar la mitad antigénica en la fusión, el fitro se incubó durante una hora, con el antisuero específico de conejo (1/10.000 a 1/100.000) en gelatina 1% disuelta en TTBS (Tris-ClH 20 mM; ClNa 0,15 M; Tween 20 0,05%) en presencia de IgGH 2 mg/ml la cual desplaza al anticuerpo de su unión inespecífica con la SPA (Löwenadler y col, 1986). Luego de tres lavados con TTBS, se realizó una tercera incubación durante 1 hora con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (Bio-Rad, USA). Después de lavar los filtros 3 veces con TTBS y tres veces con TBS y la reacción colorimétrica se efectuó con 4-cloronaftol 0,06% y agua oxigenada 0.033 Vol en TBS. La reacción se detuvo con

sucesivos lavados con agua. El clon de interés fue recuperado a partir de la otra placa de Petri..

Posteriormente el método se simplificó transfiriendo las colonias directamente de la placa madre de transformación a la nitrocelulosa. Estas dejaron una "impronta" en el agar, las que aún retuvieron bacterias, de modo tal que la colonia de interés pudo ser rescatada sin complicaciones a partir de esta.

5.4.3 - ENSAYO POR DOT BLOT

Este análisis de expresión fue realizado por siembra en papel de nitrocelulosa, de cantidades crecientes de proteína total en lisados celulares preparados como se ha descrito (sección 5.4.1) en un volumen constante de 1 ul para el caso de *E.coli* y 5 ul de sobrenadante de cultivo (sembrado de a 1 ul) para el caso de *S.aureus*. Luego de secar el papel 2 minutos a 37 °C, la presencia tanto antígeno fusionado a SPA como SPA libre, fue puesta de manifiesto siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.4.2 a partir de la incubación con gelatina 3% en TBS.

5.5 - PREPARACION DE LAS FUSIONES

5.5.1 - EXPRESION EN *E.coli* Y *S.aureus*.

Cuando la producción se efectuó en un nivel preparativo, un erlenmeyer de 2 l de capacidad conteniendo 400 ml de caldo Tripticasa-Soja suplementado con ampicilina 50 ug/ml, fue inoculado en una relación 1/100, con *E.coli* HB101

transformada, crecida toda la noche a 37 °C. El cultivo fue desarrollado hasta la fase estacionaria temprana ($DO_{600} = 2$), aproximadamente 6-7 horas a 37 °C, con agitación continua. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 x g durante 30 minutos a 4 °C.

Con el fin de recuperar la fusión en el espacio periplásmico (Randall and Hardy, 1986), las células fueron resuspendidas con 5 ml de una solución de sacarosa 0,5 M; Tris-ClH 0,1 M pH 8; EDTA 1 mM e incubadas 10 minutos en hielo. Se agregó lisozima a una concentración final de 0,16 mg/ml y la suspensión fue incubada durante 5 minutos en hielo. Luego de estabilizar los esferoplastos con 180 ul de $MgSO_4$ 1M, éstos fueron eliminados por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos y la fusión se rescató a partir del sobrenadante.

Para la expresión intracelular total (esto es: fusión localizada tanto en periplasma como en citoplasma), la ruptura celular se realizó por sonicación de las bacterias concentradas 10 veces en TST (Tris-ClH 50 mM pH 7,6; ClNa 150 mM; Tween 20 0,05%), a la máxima frecuencia durante 2-4 segundos. Los desechos celulares fueron separados por centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos y la fusión se rescató a partir del sobrenadante.

La producción extracelular en *S.aureus*, fue realizada en condiciones iguales que en *E.coli* con excepción del agregado en el medio de cultivo de pantotenato de calcio 1,5 ug/l, tiamina 1 ug/ml y ácido nicotínico 1 mg/ml (Uhlén y

col, 1984) en presencia de cloramfenicol 10 ug/ml. El cultivo fue crecido con un inóculo del 1%, durante 6 horas hasta la fase estacionaria temprana (DO_{600} de aproximadamente 2,5). Las células fueron eliminadas del medio de cultivo por 1) centrifugación a 5,000 x g durante 30 minutos y 2) por sucesivas filtraciones a través de membranas de nitrocelulosa de poro decreciente (0,8um; 0.45um y 0,22um).

5.5.2 - PURIFICACION DE LAS FUSIONES POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Las fusiones presentes tanto en los extractos crudos clarificados como en el medio de cultivo fermentado libre de células, (previamente ajustados a pH 7,6 y preservados con azida sódica 0,1%) fueron purificados por cromatografía de afinidad con IgG-Sepharosa (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) en una columna de 0.4 cm de diámetro y con un volumen de lecho de 1,5 a 2 ml. EL flujo se ajustó a 1-2 ml/minuto y cuando el volumen a procesar superó los 500 ml, se disminuyó aproximadamente 30 veces, de forma tal de dejarlo toda la noche a 4 °C.

La columna fue lavada con 10 volúmenes de TST y luego con 5 volúmenes de búffer acético/acetato de amonio 5 mM pH 5. La elución fue realizada con búffer acético/acetato de amonio 0,5 M pH 3,4 y cada fracción de aproximadamente 0,5 ml fue chequeada con reactivo de Bradford. La columna fue luego equilibrada a pH 7,6 con TST y toda la operación se repitió hasta la ausencia de proteína en el eluido. Todas la

fracciones con reacción de Bradford positivas fueron juntadas y la concentración proteica final fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). El búffer ácido fue eliminado por diálisis contra PBS, la solución fue liofilizada y el residuo almacenado a -20°C .

Un método alternativo fue la precipitación con 3 volúmenes de acetona, centrifugación a $10.000 \times g$ y eliminación de esta por evaporación a 37°C . El precipitado fue resuspendido con PBS y guardado a -20°C . Posteriormente, la concentración de proteínas fue verificada por la técnica anteriormente mencionada.

5.6 - OBTENCION DE LA PROTEINA AUTENTICA

5.6.1 - PROTEOLISIS ESPECIFICA

El tratamiento con enteropeptidasa se realizó en base al protocolo de Hopp (Hopp y col 1988). Se empleó la enzima de origen porcino, purificada por cromatografía (Sigma, USA). A menos que esté indicado, la reacción fue hecha en búffer fosfato de sodio 10 mM pH 8 a 37°C durante toda la noche.

El tratamiento con factor Xa estuvo basado en el protocolo de Smith (Smith & Johnson, 1988), y consistió en incubar el sustrato con la enzima en una relación de masas variable, en búffer Tris-ClH 50 mM pH 8; Cl_2Ca 1mM ; ClNa100 mM a una temperatura de 25°C durante 2 horas.

5.6.2 - ULTERIOR PURIFICACION

Una vez realizada la proteólisis, el antígeno sin la proteína A en la mezcla de productos (Antígeno libre, proteína A y restos de fusión sin clivar) fue separado por un segundo pasaje a través de la columna de afinidad IgG-Sepharosa obteniéndose la proteína auténtica en el efluente, quedando retenidos en la matriz, la proteína A y los restos de fusión sin clivar, los que fueron eliminados por elución a pH 3,4.

La cantidad de antígeno libre recuperado en el efluente fue determinada mediante la siguiente forma: $P_{TE} - P_{TEP}$ donde P_{TE} es la proteína total en el efluente y P_{TEP} es la proteína total debida al agregado de enteropeptidasa. La preparación comercial (Sigma USA) contiene albúmina bovina y su actividad específica fue de 125 Us/mg de proteína.

5.7 - ANALISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DESNATURALIZANTE DE POLIACRILAMIDA Y *Western-Blot*

Las muestras protéicas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), según Laemmli (Laemmli y col 1973) a 50 V durante toda la noche. Para la tinción de las proteínas totales, el gel fue tratado con Coomassie-Blue R250 (Sigma, Usa) en solución de metanol 50%; ácido acético 7,5%; decolorado con la misma solución, sin el colorante y secado durante 1 hora en un secador de vacío a 80 °C. La determinación de los pesos

moleculares fue realizada usando un patrón de peso molecular de alto rango (BRL, USA).

Para la identificación de los antígenos fusionados a SPA o libres se realizó el ensayo de *Western Blot* a partir de protocolos establecidos (Sambrook y col 1989) los que fueron modificados. Una vez que las proteínas fueron corridas en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro, en una celda Trans Blot (BioRad, USA). La electrotransferencia fue realizada en búffer Tris-glicina (Tris 25 mM; glicina 0,3M) pH 8,3; metanol 20% a 45 V durante 2 horas. El filtro fue lavado dos veces con TBS para eliminar el metanol y bloqueado con gelatina 3% en TBS durante 1 hora. Cuando fue requerido, la SPA libre o fusionada fue bloqueada con IgG humana (IgG-H) 2 mg/ml con el fin de eliminar la unión de las IgG_e de conejo a esta (Löwenadler y col, 1986)

Cuando se quiso visualizar solamente el antígeno, el filtro fue incubado con el antisuero específico hecho en conejo en una relación 1/10.000 - 1/5.000 durante 1 hora a temperatura ambiente, en presencia de IgG-H 2 mg/ml. Luego de lavar 3 veces durante 5 minutos con TTBS se realizó una segunda incubación con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (BioRad, USA) en relación 1/1.000 durante una hora a temperatura ambiente, en presencia de IgG-H 2 mg/ml. Después de lavar 3 veces con TTBS y 3 veces con TBS durante 5 minutos, se desarrolló la reacción colorimétrica con 4-cloronaftol 0,06% y agua oxigenada 0,033 V en TBS.

En el caso de visualizar la SPA tanto libre como en la fusión, el filtro fue incubado, luego del bloqueo con gelatina e IgG-H, con anticuerpo anti-humano conjugado con peroxidasa (BioRad, USA) en una relación 1/1.000 en TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en ausencia de IgG-H. Después de 3 lavados con TTBS y 3 lavados con TBS, la reacción colorimétrica se realizó de igual forma que la anterior.

(*) Los fragmentos de ADN correspondientes a los antígenos, sus secuencias y los respectivos antisueros específicos hechos en conejo, fueron aportados por A.C.C. Frasch. Instituto de investigaciones Bioquímicas. "Fundación Campomar"

5.8 - C E P A S H O S P E D A D O R A S

Escherichia coli DH5-alfa

Genotipo: F⁻ Fi80d lacZ delta M15 delta(lacZYA-argF)U169
endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) supE44 lambda⁻ thi-1, gyrA relA1

Referencia: Focus (1986) 8: 2, 9

Escherichia coli HB101

Genotipo: F⁻ hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1
galK2 rpsL20(str^r) xyl-5 mtl-1 sup44 lambda⁻.

Referencia: Mol Biol (1969) 41, 459.

Escherichia coli JM101

Genotipo: delta(lac-proAB) supE thi / F' traD36 proAB+ lacI^{qZ}
deltaM15.

Referencia: Nucl Acids Res (1981) 9, 309.

Staphylococcus aureus SA113

Genotipo: r⁻ m⁺ tox⁻

Referencia: J Gen Microbiol (1976) 96, 277

Staphylococcus aureus RN4220

Genotipo: r⁻ m⁺ tox⁻

Referencia: Nature (1986) 305, 709.

6 - RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 - ANALISIS DE LAS SECUENCIAS

6.1.1 - SITIOS DE RESTRICCIÓN

El análisis de los sitios de restricción en el antígeno 1 (Ag1) (figura 2A), mostró una repetición invariable de estos, cada 204 nucleótidos (ver por ejemplo *HindIII*) siguiendo el motivo de secuencia repetida ya que la unidad esta totalmente conservada. Esto ocasionó algún problema para la determinación de la orientación, cuando el inserto fue subclonado en los vectores de expresión.

La misma situación se presentó en el Ag 30 (figura 2B). La unidad, de 42 pb, no se conservó totalmente y esto se reflejó en la existencia de, por ejemplo, solo dos sitios *DdeI*, dos sitios *HaeI*, dos sitios *HaeIII* ect.; mientras que la sistemática repetición de sitios *AluI* y *PvuII* cada 42 pb puso en evidencia el motivo. La zona donde hay un acúmulo de sitios para distintos tipos enzimas de restricción, se debió a una ambigüedad en la posición 280 - 283.

La secuenciación incompleta del clon 13 solo permitió el estudio de la zona repetida (472 pb), mostrando variantes para algunas enzimas ya que la unidad no se conservó totalmente (figura 2C). Un único sitio PstI se encuentra 900 pb hacia el extremo 3' (comunicación personal).

La secuencia disponible del SAPA comprende toda la zona codante, en donde puede verse, por ejemplo (figura 2D) que los sitios para *HinfI*, *RsaI* y *TaqI*, dan la ubicación de la

FIGURA 2 A

Esquema general de los sitios de restricción del fragmento de ADN correspondiente al antígeno 1.

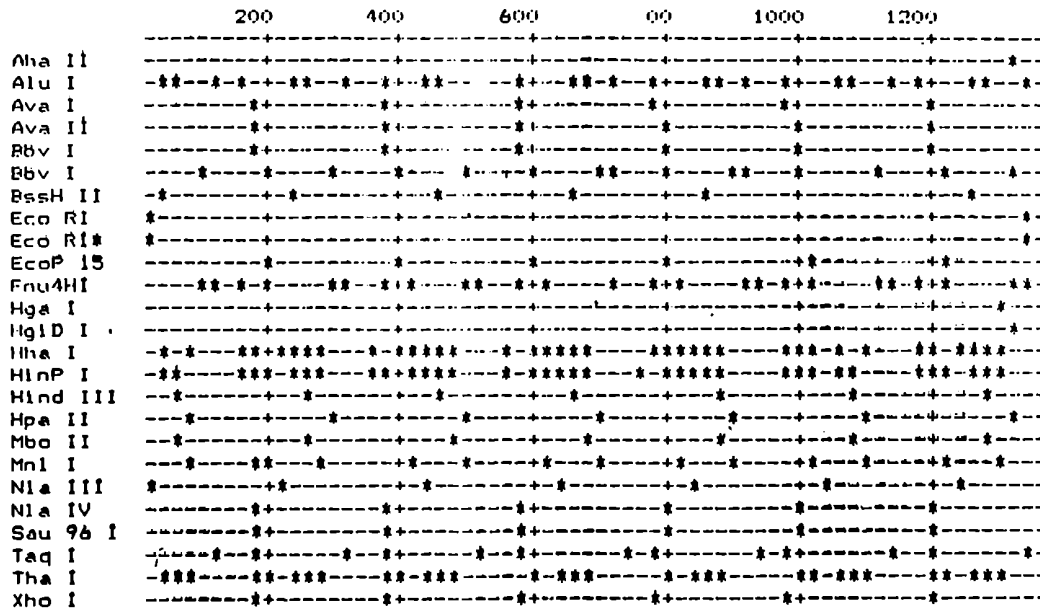
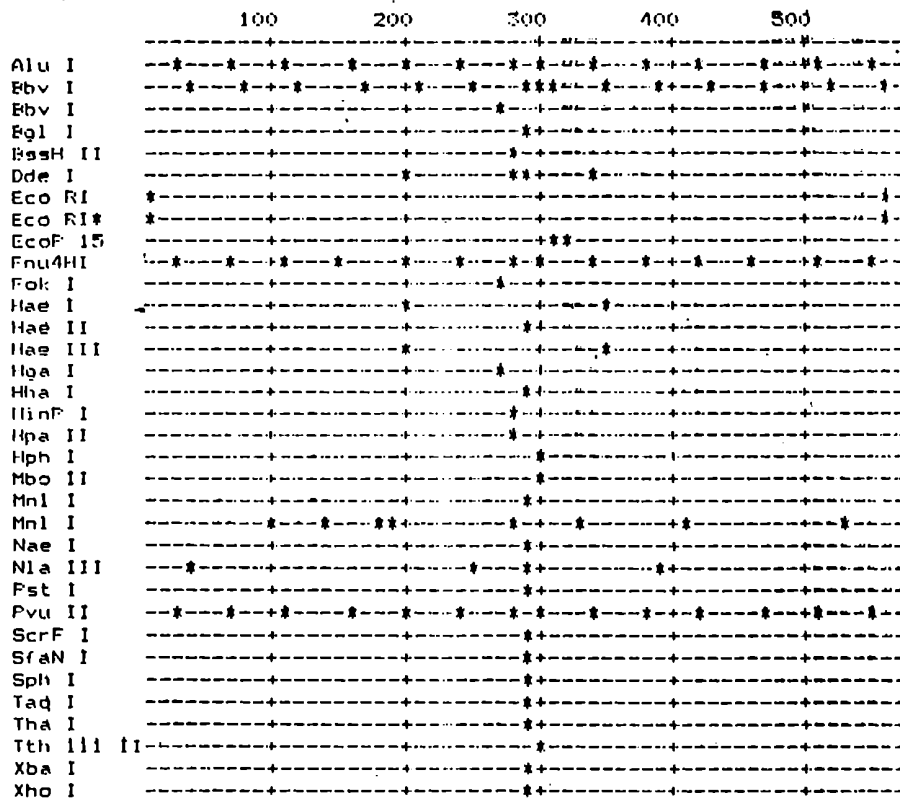


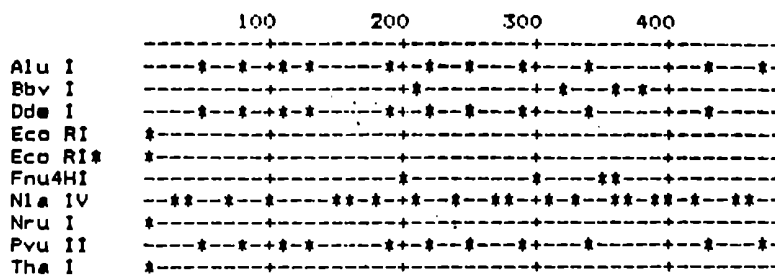
FIGURA 2 B

Esquema general de los sitios de restricción del fragmento de ADN correspondiente al antígeno 30.



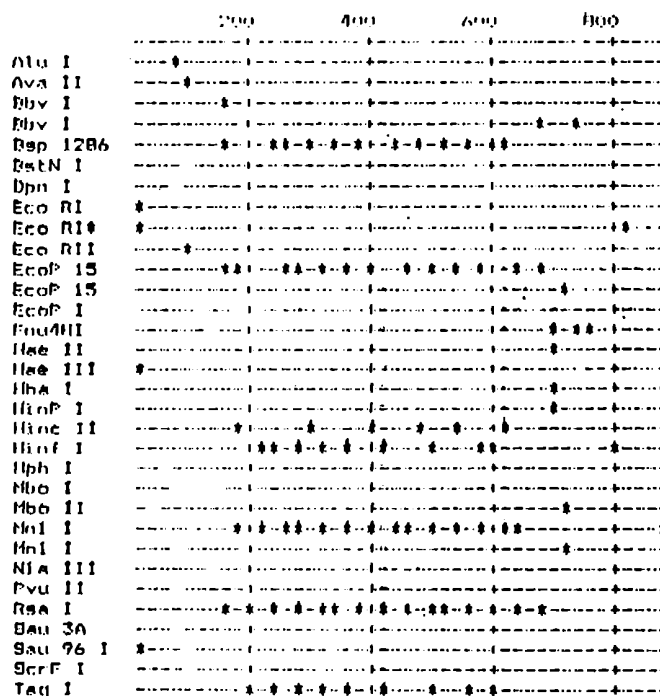
F I G U R A 2 C

Esquema general de los sitios de restricción del fragmento de ADN correspondiente al antígeno 13.



F I G U R A 2 D

Esquema general de los sitios de restricción del fragmento de ADN correspondiente al antígeno SAPA.



zona de repetición en el fragmento. Los sitios únicos fueron *AvaI*, *AvaII*, *HaeIII*, *NlaIII*, *Sau3AI*. Otros sitios únicos como *HaeII*, *PvuII*, *SspI*, y *PstI* fueron comunicados en forma personal, y posteriormente confirmados en forma experimental.

6.1.2 - PERFILES HIDROPATICOS

Una vez traducidas la secuencias nucleotídicas a sus respectivas secuencias aminoacídicas, se realizó un perfil de hidropatía de cada una de ellas, con el fin de estimar las regiones antigénicas mas importantes (Hopp & Woods, 1981; Welling y col 1985). El Ag 1 y 30 (figura 3A, 3B), presentan hidrofiliidad en casi toda la unidad, encontrándose pequeñas regiones hidrofóbicas. Podría decirse, en ambos casos, que toda la unidad es de importancia.

En el fragmento correspondiente al SAPA, se estudiaron tres regiones separadas: la N-terminal, la zona de repetición y la C-terminal (figura 3C). La N-terminal posee dos zonas hidrofóbicas separadas por una hidrofílica, a continuación se encuentra la repetición totalmente hidrofílica y la última, C-terminal, es hidrofóbica en su totalidad. En esta se encontraría la zona de anclaje a la membrana (Pollevick y col 1991). De nuevo la repetición sería la zona inmunodominante ya descrita (Buschiazzo y col 1991).

En el caso del 13 (figura 3D) la hidrofiliidad fue total, con la salvedad de que la secuencia no está completa. De todas formas se podría decir que esta zona es inmunológicamente importante.

FIGURA 3 A

Perfil de hidropatía de una unidad de repetición correspondiente al antígeno 1, la cual se compone de 68 residuos.

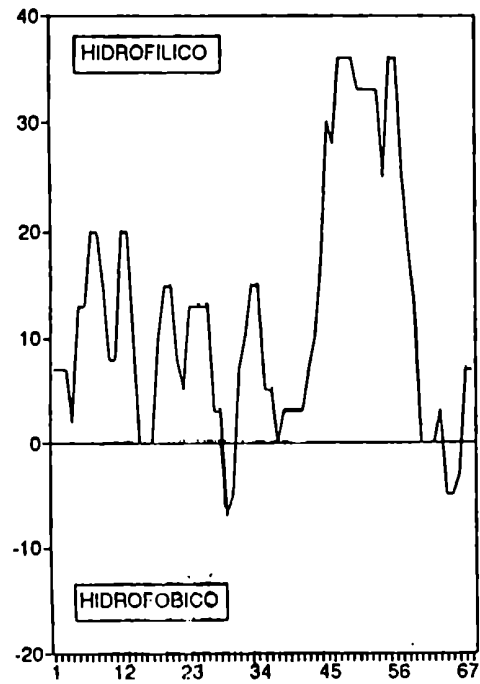


FIGURA 3 B

Perfil de hidropatía de una unidad de repetición correspondiente al antígeno 30, la cual se compone de 14 residuos.

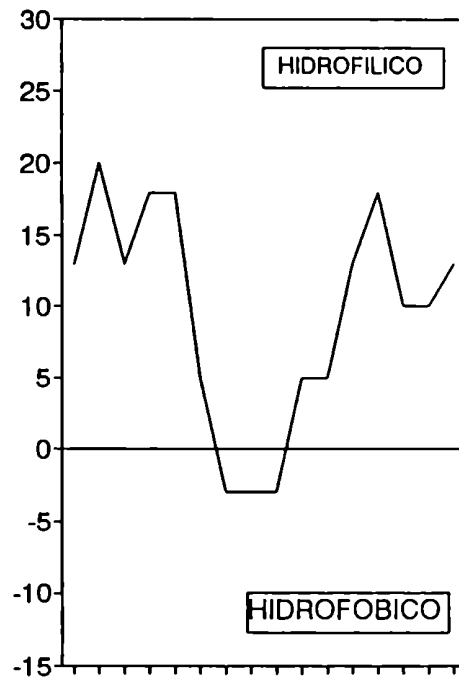
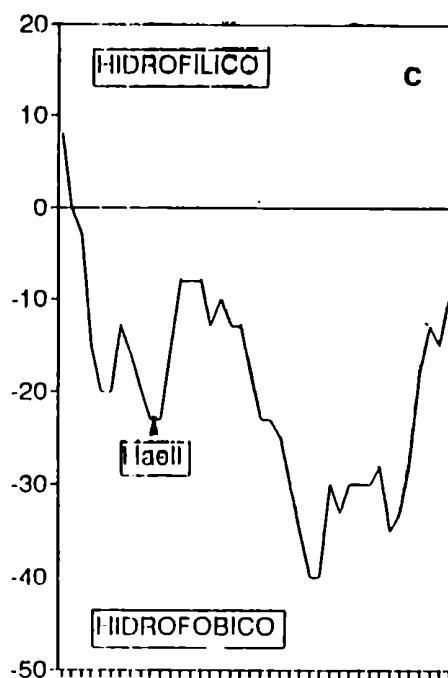
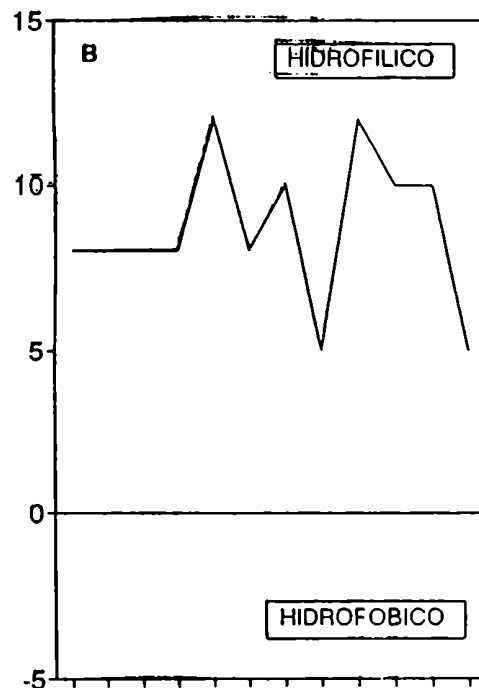
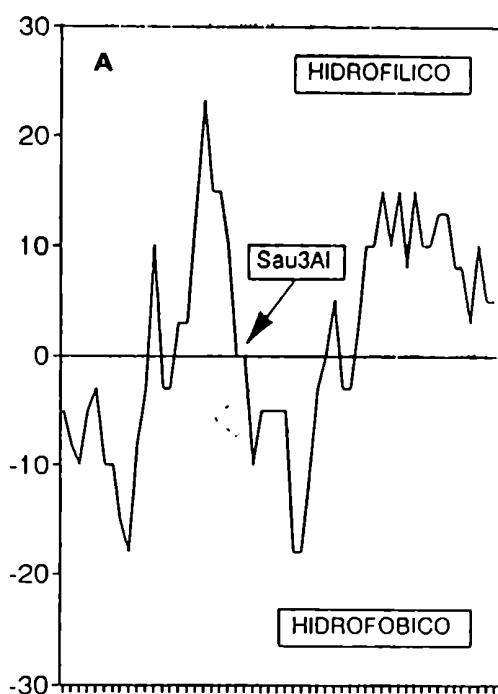


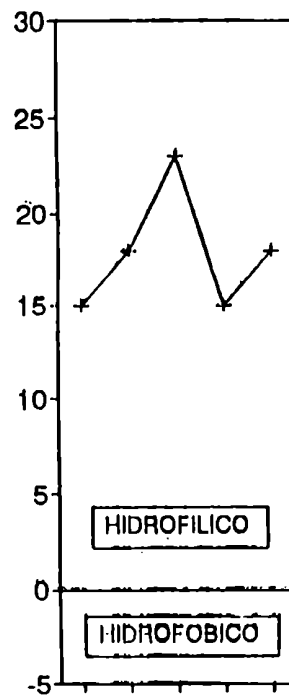
FIGURA 3 C

Perfil de hidropatía del antígeno SAPA, el cual fue estudiado tomando tres regiones por separado. A, zona correspondiente al extremo N-terminal, donde se muestra el sitio colineal al fragmento de ADN, *Sau3AI*. B, una unidad de repetición correspondiente a la zona central, compuesta de 24 residuos. C, zona correspondiente al extremo C-terminal, donde se muestra el sitio colineal al fragmento de ADN, *HaeII*.



F I G U R A 3 D

Perfil de hidropatía de una unidad de repetición correspondiente al antígeno 13, la cual se compone de 5 residuos.



De esta forma se ha confirmado (al menos en forma teórica) cual región es prescindible y cual no, para las construcciones genéticas, sobre todo en el caso del SAPA.

6.1.3 - SITIOS SENSIBLES A PROTEASAS ESPECIFICAS

Con excepción al SAPA, todos los antígenos restantes presentaron múltiples sitios sensibles a la tripsina en toda la molécula (ver tabla). Un análisis de homología realizado a través del mismo programa mostró la ausencia de sitios sensibles a la enteropeptidasa (Ep) y al factor Xa aunque se encontró dentro de la unidad del Ag 1 un sitio parecido para la Ep (Leu Asp Asp Asp Ser).

Otros datos de alguna importancia determinados teóricamente por el mismo programa se detallan en la siguiente tabla:

| Antígeno | Peso Molecular calculado (KDa) | P.I.(estimado) | S.S.T | S.S.B. |
|-------------------|--------------------------------|----------------|-------|--------|
| 1 | 52,0 | 5,63 | 86 | 14 |
| 30 | 19,5 | 7,00 | 40 | 4 |
| SAPA _r | 25,4 | 5,38 | 2 | 1 |
| SAPA _h | 22,4 | 5,32 | 2 | 1 |
| SAPA _e | 19,6 | 5,32 | 1 | 1 |

S.S.T.: Sitios sensibles a la tripsina. S.S.B.: Sitios sensibles al bromuro de cianógeno. P.I.: Punto isoeléctrico

SAPA_{F,H,G} son proteínas correspondientes al SAPA codificadas por los fragmentos $f_{7,2H,2H}$ respectivamente los que se detallan en la figura 14A (pag 116).

6.2 - EXPRESION DEL ANTIGENO 1 FUSIONADO A SPA EN *E.coli*

6.2.1-SUBCLONADO DEL FRAGMENTO DE 1,3 Kb AL VECTOR DE

EXPRESION

El fragmento de 1,3 Kb fue preparado por digestión del vector pUC19 con el inserto, usando la enzima *EcoRI* y purificado por electroelución. Después de haber ligado al vector pRIT11, en el mismo sitio, los productos resultantes fueron introducidos en *E.coli* DH5-alfa por transformación (sección 5.2). Se ha obtenido una colección de 12 clones con inserto, a partir de un muestreo de 50 colonias elegidas al azar, siguiendo el método mencionado (sección 5.2), (figura 4A). Estos plásmidos fueron "linearizados" con el fin de estudiar la presencia de mas de un fragmento dentro del vector ya que se trató de un subclonado con puntas iguales. La figura 4B (pag 74) muestra la presencia un inserto por vector en 10 de los 12 clones con un peso molecular observado de 8.5 (versus el teórico 8,4 Kb = 7,1 Kb + 1,3 Kb). En los clones 6 y 27, el peso molecular observado de 9,5 Kb, reveló la presencia de dos fragmentos en el vector [peso molecular teórico 9,7 Kb = 7,1 Kb + 2x(1,3 Kb)]. Por lo tanto estos dos últimos fueron descartados por la posibilidad de generar

FIGURA 4 A

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los 12 plásmidos recombinantes digeridos con *EcoRI*, realizada como se ha descrito en Materiales y Métodos. **A**: nueve clones analizados con su correspondiente numeración; **p11**, pRIT11 digerido con *EcoRI*; **p1**, plásmido pUC19 con el inserto de 1,3 Kb digerido con *EcoRI*. **B**: tres clones mas analizados como en A con un clon del gel anterior como referencia; **f₁**, fragmento de ADN del antígeno 1 purificado por electroelución; **p11** pRIT11 digerido con *EcoRI*. Las barras al costado izquierdo corresponden al patrón de peso molecular, ADN de fago lambda digerido con *HindIII*: 23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,5 Kb; 4,3 Kb; 2,3 Kb; 2,0 Kb; 0,5 Kb.

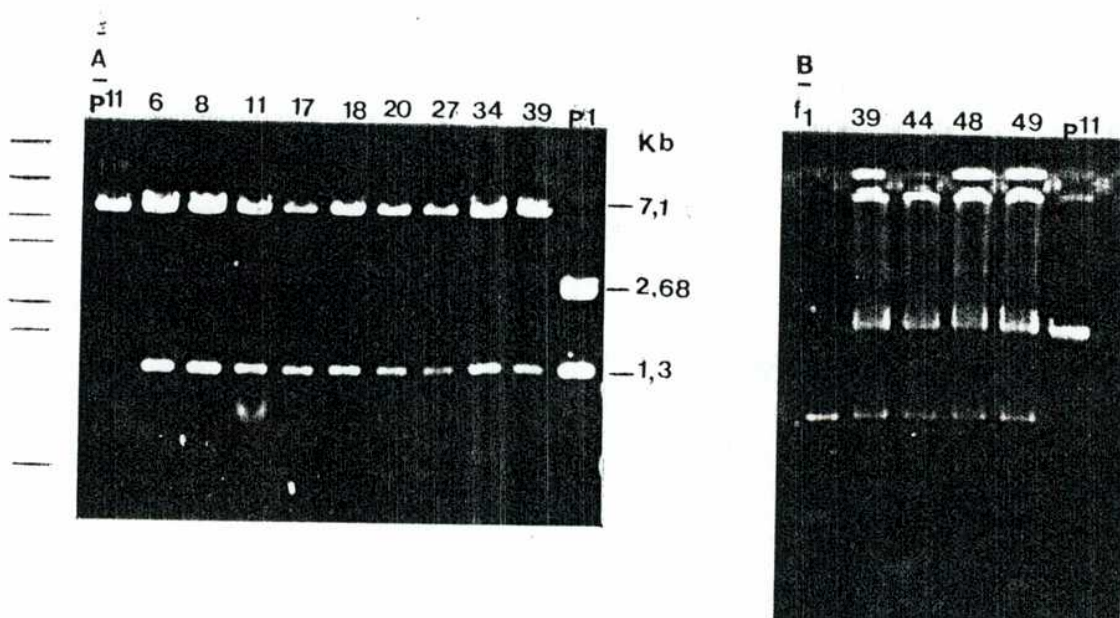


FIGURA 4 B

Electroforesis en gel de agarosa 0,6% de 11 clones de la figura anterior digeridos con *SaII*. Como hay un solo sitio en el plásmido, la banda corresponde al plásmido linearizado. M. ADN de fago lambda digerido con *HindIII*. p11, pRIT11 digerido con *EcoRI*.

6 8 11 17 18 20 M 27 34 39 48 49 p11



secuencias polipeptídicas no esperadas, al no tener señal de terminación de la traducción dentro del inserto.

6.2.2 - PRODUCCION DE LA FUSION SPA-Ag1, EN *E.coli*

Puesto que los sitios de restricción en este inserto se repiten, siguiendo el motivo de secuencia repetida, su orientación en el subclonado no fue determinada, como ya se explicó en la sección 5.2.3. El promotor de la SPA es funcional en *E.coli* (Löwenadler y col, 1986), por lo tanto la fusión también lo será, si la proteína en la fusión no es tóxica para el hospedador. Así la orientación y la expresión fue determinada, en primera instancia, en un solo paso.

Los 12 clones fueron estudiados por inmunoprecipitación en gel (ver sección 5.4) mostrando que 6 de estos reaccionaron positivamente frente al antisuero (As) específico de conejo (figura 5A, pag 77).

Debe tenerse en cuenta que la SPA reacciona con IgG de conejo (Lindmark y col, 1983) ya sea libre o en una fusión y por lo tanto las bandas de precipitación observadas pueden ser debidas a la reacción de las IgG de conejo con la SPA de la fusión y no a una reacción específica antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Si esto fuese cierto, la reacción del As específico con la SPA proveniente de extractos de *E.coli* con vector sin inserto daría una banda visible (ver posillo C). Esto no indicó una reacción negativa sino que la sensibilidad de este método impidió verla, mientras que la reacción específica Ag-

Ac fue tan fuerte que pese a esta baja sensibilidad pudo visualizarse sin inconvenientes.

Para confirmar que la señal en este tipo de ensayo fue por una reacción específica, 10 μ l de extracto (1,14 mg/ml) proveniente del clon 34 (EC34) fue incubado con 10 μ l de IgG-H (100 mg/ml) durante toda la noche a temperatura ambiente, de forma tal de saturar todos los sitios de unión a la IgG en la SPA de la fusión. Esta luego fue enfrentada con: el As específico de conejo y con IgG-H. Los resultados de la figura 5B mostraron que cuando el extracto fue preincubado con IgG-H, (34_x) no se encontró la banda de identidad parcial, la que se visualizó cuando el extracto sin preincubar (34_{Nx}) fue enfrentado a IgG-H; mientras que la banda correspondiente al Ag/Ac específico permaneció sin ser alterada. Por lo tanto se estuvo en presencia de una auténtica fusión SPA-Ag1. Resultados posteriores confirmaron estas conclusiones.

6.3 - EXPRESION DE LA FUSION SPA-Ag 1, EN *S aureus*

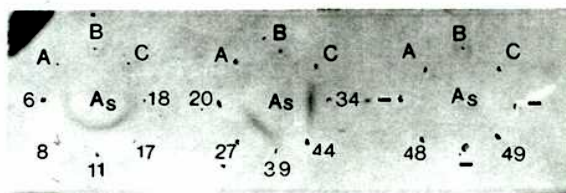
6.3.1-TRANSFORMACION DE *S.aureus* SA113

El plásmido correspondiente al clon 34, pJ34, fue amplificado en *E.coli* extraído y purificado según los protocolos ya mencionados, el cual fue usado para transformar *S.aureus* SA113 según el método de Chang y Cohen modificado (sección 5.3).

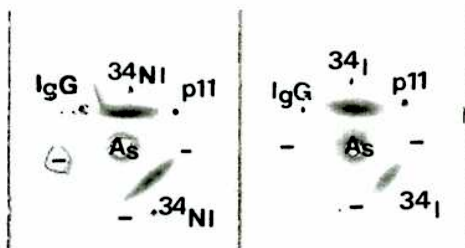
Uno de los pasos mas importantes en la transformación fue la formación de protoplastos, la que se evaluó por la disminución en la DO₆₀₀ de la suspensión en función del

FIGURA 5A

Inmunoprecipitación en gel de agarosa. Los extractos correspondientes a los 12 clones mostrados en la figura 4A fueron preparados como se indicó en Materiales y Métodos. En todos los pocillos, salvo el A, se han sembrado 10 ug de proteína total. A, 20 ul de PBS; B, extracto de *E. coli* sin transformar; C, extracto de *E. coli* transformada con pRIT11 (fuente de proteína A). As, antisuero específico de conejo anti-1.

**FIGURA 5B**

Inmunoprecipitación en gel de agarosa. IgG, 100 ug de IgG humana (IgG-H); 34_{Ni}, extracto del clon 34 no preincubado con IgG-H; 34_I, extracto del clon 34 preincubado con IgG-H. p11, 10 ug de proteína total de extracto de *E. coli* transformada con pRIT11; As, antisuero específico de conejo anti-1.



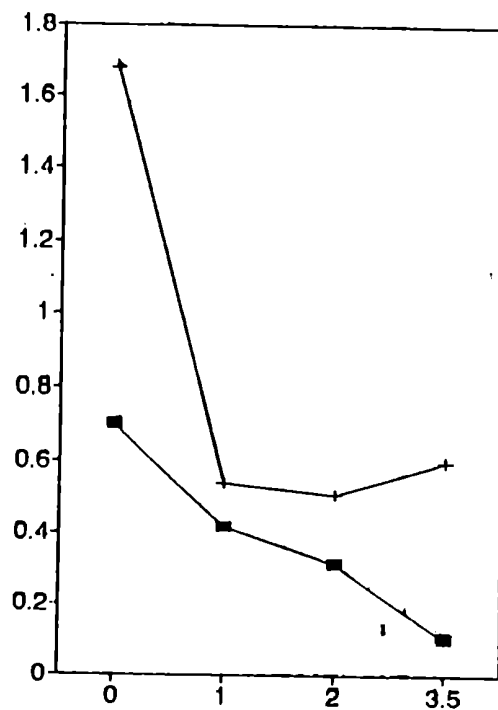
tiempo. La figura 6A muestra dos curvas típicas. En una de ellas puede verse que la DO_{600} no se estabiliza y continúa decreciendo luego de las 3 horas de tratamiento enzimático. Estos protoplastos no fueron competentes para la transformación. La otra curva muestra una estabilización en la DO_{600} luego de las 3 horas a un valor equivalente al 35% del original, siendo estos protoplastos competentes. La diferencia fue que en el primer caso las células crecieron sin glucosa mientras que en el segundo lo hicieron en presencia de esta. Aunque esta técnica no resultó ser reproducible y muy poco eficiente, se han logrado obtener clones transformados. En la siguiente tabla se detallan los resultados de la transformación por este método, con este plásmido y con otros.

| Plásmido | Vector (PM, Kb) | Inserto (PM, Kb) | Cantidad de ADN (ug) | Nº de UFC/P |
|----------|-----------------|------------------------|----------------------|-------------|
| - | pRIT5 (6,9) | - | 1 | 1 |
| - | pRIT11 (7,1) | - | 1 | 4 |
| pJ34 | pRIT11 | f ₁ (1,3) | 1 | 1 |
| pI30 | pRIT11 | f ₃₀ (0,65) | 1 | 2 |
| pA13 | pRIT11 | f ₁₃ (2,2) | 1 | 8 |
| pA13 | pRIT11 | f ₁₃ | 0,5 | 1 |
| pF7 | pRIT11 | f ₇ (1,95) | 1 | 2 |

UFC/P: Unidades Formadoras de Colonias Transformadas por placa. PM: Peso Molecular.

FIGURA 6A

Control de la formación de protoplastos de *S.aureus* por disminución de la DO_{600} en función del tiempo. (+), a partir de células crecidas en presencia de glucosa 0,1%. (■), a partir de células crecidas en ausencia de glucosa.



El contenido plasmídico de la cepa de *S. aureus* SA133 transformada, SA34, fue analizado como se describió en la sección 4.2.2. La figura 6B, muestra que el pJ34 conservó todo su material durante el proceso de transformación.

6.3.2-PRODUCCION DE LA FUSION SPA-Ag1 EN *S. aureus*

El clon SA34 fue crecido como se indicó en la sección 4.3.1. Las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con PBS, las que se lisaron por sonicación. La presencia de la proteína fusión, fue chequeada ya sea en el lisado celular clarificado como en el medio de cultivo libre de células, por inmunoprecipitación en gel demostrando que en *S. aureus*, la fusión se transporta al medio extracelular y no permanece dentro de la célula (figura 6C₁, pag 82). Ya que la sensibilidad del método empleado fue baja, podría decirse que se trata de una localización mayoritaria.

Cuando se confrontaron conjuntamente el extracto de *E. coli*, EC34 y el medio de cultivo crecido con *S. aureus* SA34 contra el As específico, se observó una única banda de identidad demostrando que las fusiones producidas por ambas especies son idénticas (figura 6C₂, pag 82). Por lo tanto la proteína es perfectamente expresable no solo en *E. coli* sino también en *S. aureus*, siendo eficiente el transporte al exterior en esta última.

FIGURA 6 B

Transformación de *S.aureus* con el plásmido pJ34 y con pRIT11. A, electroforesis en gel de agarosa 0,6% de los plásmidos sin digerir: 1, pRIT11 extraído a partir de *E.coli*; 2, pJ34 de *S.aureus*; 3, pJ34 de *E.coli*. B, electroforesis en gel de agarosa 1% de pJ34_s digerido con *EcoRI*: 1, a partir de *S.aureus*; 2, de *E.coli*. C, electroforesis en gel de agarosa 0,6% de un control realizado con pRIT11: M, ADN de fago lambda digerido con *HindIII*; 1, pRIT11 a partir de *E.coli* digerido con *EcoRI*; 2 y 3 dos clones independientes de *S.aureus* transformados con el mismo y digeridos con la misma enzima.

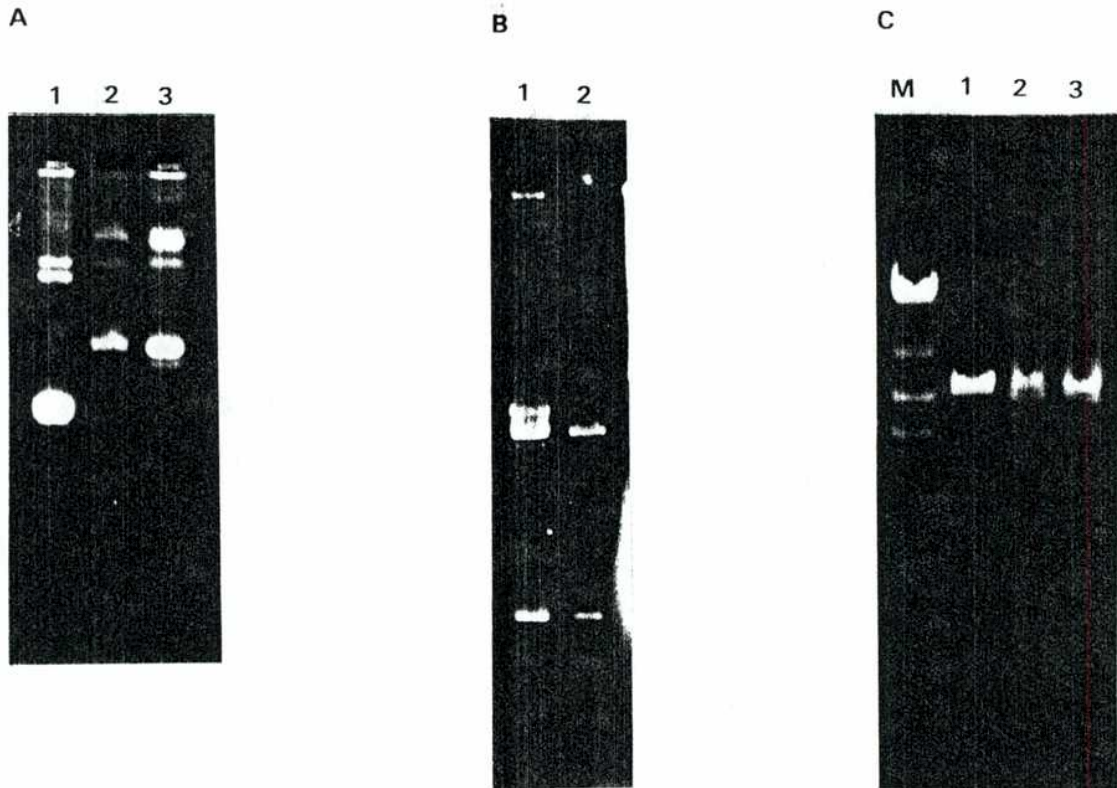


FIGURA 6 C₁

Localización de la fusión SPA-Ag1 en *E.coli* y *S.aureus* por inmunoprecipitación en gel. Reactividad contra antisuero específico de conejo (A) o IgG-H (B). 1, extracto de células transformadas con pJ34; 2, extracto de células transformadas con pRIT11; 3, extracto de células no transformadas; 4, medio de cultivo de células no transformadas; 5, medio de cultivo de células transformadas con pRIT11 y 6, medio de cultivo de células transformadas con pJ34. Nótese la banda de identidad en B entre la fusión y la SPA libre, indicando la presencia de SPA en la fusión.

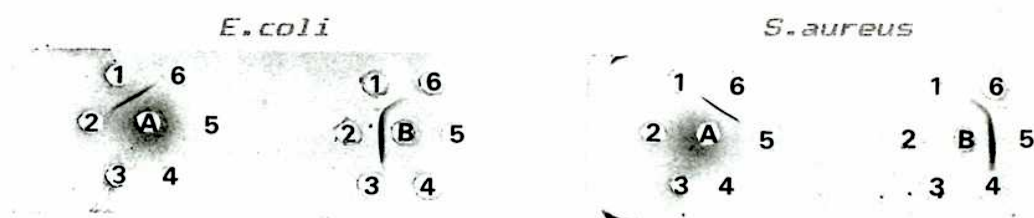
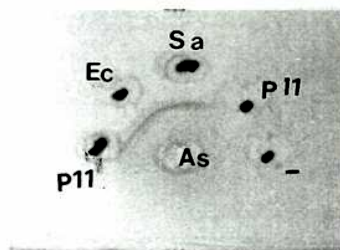


FIGURA 6 C₂

Inmunoprecipitación en gel mostrando la identidad entre las fusiones producidas por *E.coli* (Ec) y *S.aureus* (Sa). p11 extracto de *E.coli* transformada con pRIT11 (fuente de proteína A). As, antisuero específico de conejo.



6.4 - ESTUDIOS COMPARATIVOS ENTRE AMBAS ESPECIES.

6.4.1- EXPRESION PURIFICACION DE LA FUSION SPA-Ag 1 EN CANTIDADES PREPARATIVAS.

Para establecer cual hospedador fue mas conveniente en función de una producción a gran escala, ambas especies (EC34 y SA34) fueron crecidas de acuerdo a los protocolos ya mencionados (sección 5.5.1). En el caso de EC34 (la cepa utilizada fue HB101, Nilsson y col 1985) se procesó un volumen de cultivo de 100 ml. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 10 ml de PBS y fraccionadas en 0,5ml en tubos Eppendorf para lograr una óptima ruptura por sonicación. Otra fracción equivalente fue destinada para el estudio del transporte al periplasma. Se estudió también la presencia de la fusión en el medio de cultivo.

En el caso de SA34 se utilizó 300 ml de medio de cultivo, clarificado como se ha mencionado previamente (sección 5.5.1) y una masa celular equivalente a 100 ml de este, tratada de igual forma que en *E.coli*. La fusión presente ya sea en los extractos como en los correspondientes medios de cultivos, fue rescatada y purificada por cromatografía de afinidad, IgG-Sepharosa (Farmacia, Suecia) y la cantidad de proteína en el eluido fue evaluada siguiendo toda la metodología ya descrita (sección 5.5.2). Los resultados son expuestos en la siguiente tabla:

| Hospedador | Localización | Cantidad de fusión recuperada (mg/litro de cultivo) |
|-----------------------|--------------|--|
| <i>E.coli</i> HB101 | celular | 13,22 |
| <i>E.coli</i> HB101 | periplasma | 1,84 |
| <i>E.coli</i> HB101 | extracelular | 0,10 |
| <i>S.aureus</i> SA113 | celular | N.D. |
| <i>S.aureus</i> SA113 | extracelular | 14,45 |

N.D. Cantidades no detectables por el Método de Bradford

Estos valores no indicaron diferencias en la cantidad de proteína fusión producida por ambas especies. La ausencia de proteína fusión en los extractos celulares de *S.aureus* indicaron que el transporte al exterior de la fusión fue óptimo, o bien, una alta actividad proteolítica intracelular la que explicaría la no recuperación de la fusión. La proteína recuperada a partir del periplasma de *E.coli* rindió un 14% de la obtenida por sonicación. Este bajo rendimiento, pudo deberse a la ineficacia del método o bien a un transporte deficiente de la fusión al espacio periplásmico. La localización extracelular en *E.coli* fue extremadamente pobre en comparación a, por ejemplo, "Insulin-like growth factor" fusionada a SPA, la cual el 85% es secretado al exterior (Moks y col, 1987a).

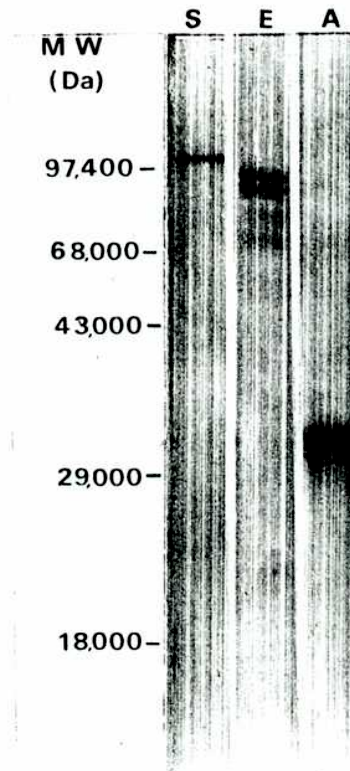
6.4.2.- ANALISIS DE LA FUSION POR ELECTROFORESIS EN GEL DESNATURALIZANTE DE POLIACRILAMIDA

La SPA y el Ag 1 tienen un peso molecular esperado de 31 KDa y 52 KDa respectivamente por lo tanto la fusión debería presentar un peso molecular de 83 KDa. Los resultados de la figura 7A indican un peso molecular de 98 KDa y 90-87 KDa para *S.aureus* y *E.coli* respectivamente. No se ha podido explicar esta falta de concordancia, sobretodo en la proteína de *S.aureus*. Sin embargo pueden darse algunas interpretaciones al respecto:

- 1) La señal de terminación de la traducción no se encuentra inmediatamente después del inserto y este conserva el marco de lectura respecto a la SPA (ver figura 1, pag 29). Cuando la SPA libre es expresada en *S.aureus* y purificada de igual forma, corre con un peso molecular de 34 KDa y no de 31 KDa. Este último peso molecular corresponde a la SPA madurada en el N-terminal, es decir sin la señal de secreción (Abrahmsén y col, 1985), hasta el sitio C-terminal de clivado para la Ep, por lo tanto los 3 KDa de diferencia corresponden a secuencias "rioabajo" de este sitio. Cuando se trató con Ep la SPA libre el peso molecular disminuyó al valor esperado de 31 KDa (ver figura 8B, pag 92) indicando que la diferencia de 3 KDa se debe a la existencia de la señal de terminación a unos 80 pb rioabajo del sitio de Ep. Esto se da tanto en este caso como en la fusión puesto que el marco de lectura se conserva

FIGURA 7A

Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% desnaturalizante de la fusión SPA-Ag1 producida por *S.aureus* (S) y *E.coli* (E). (A), proteína A purificada por afinidad de *S.aureus* transformada con pRIT11. MW, pesos moleculares del patron de alto rango que incluye, de mayor a menor peso molecular: miosina, fosforilasa b, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica y beta-lactoglobulina.



al finalizar el inserto lo cual explica solo un aumento de 3 KDa.

2) El Ag presenta un motivo de secuencia repetida lo que ocasionaría de alguna forma un retraso en la corrida aún cuando esta se haya hecho en condiciones desnaturalizantes. De hecho, el antígeno libre de SPA posee un peso molecular observado de aproximadamente 67 KDa (ver mas adelante, figura 8A, pag 91). Todos los antígenos libres de SPA mostraron el mismo fenómeno de tener un peso molecular aparentemente mayor al esperado (ver mas adelante). Este fenómeno también se presentó con el Ag16 de *P.falciparum* el cual posee un motivo de secuencia repetida (Bianco y col, 1986) donde peso molecular calculado fue de 20 KDa mientras que el observado fue de 30 KDa, aproximadamente (Smith & Johnson, 1988).

Por último, la diferencia observada entre las proteínas producidas por ambas especies, pudo ser debida a que en *E.coli*, la degradación proteolítica es mas intensa, la que explica la presencia de dos bandas y no a una diferencia en la molécula *per se*.

Cuando la fusión ya purificada, proveniente de SA34, fue incubada a 37 °C durante toda la noche en búffer fosfato 10 mM pH 8,0 en ausencia de enzima se observó, mediante el análisis por SDS-PAGE, que esta se degradaba (figura 7B, pag 89). El mismo fenómeno se observó cuando la fusión dializada (sin el búffer de elución, pH=3,4) fue guardada a - 20 °C durante uno o dos meses. La proteína recién purificada con el buffer de elución y sembrada directamente en el gel, no

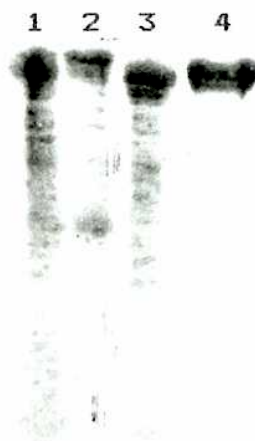
presentó dicha degradación . Estos resultados indicaron la copurificación de la proteína fusión con una proteasa propia del hospedador. Este problema fue resuelto repurificando la fusión de la misma forma que la primera vez con la diferencia de haber lavado la matriz de la columna con 10 volúmenes de TST NaCl 0,5 M antes de la elución. El resultado de la figura 7C confirma la eliminación de la proteasa contaminante.

El hospedador mas conveniente fue *S.aureus* por las siguientes razones:

1) Se descarta el proceso de ruptura celular el cual simplifica en gran medida todo el procedimiento. Si bien existen otras formas de ruptura, por ejemplo, el tratamiento con cloruro de guanidina, este requiere adicionar un segundo paso de eliminación del agente activo con el fin de poder emplear la cromatografía de afinidad. La ruptura con NaOH 0,5 N necesitó un tratamiento posterior con nucleasas ya que la viscosidad ocasionada por el ADN cromosomal, impidió el pasaje a través de la columna cromatográfica. Esto encarecería el procedimiento de rutina. Se han realizado ensayos preeliminares usando estos métodos y resultaron ser poco prácticos. Por otra parte la sonicación se complicaría al procesar grandes masas bacterianas mientras que en *S.aureus* virtualmente no hay límites en el volumen a procesar.

2) La recuperación de la fusión partir de extractos periplasmáticos en *E.coli* fue ineficiente y por lo tanto este procedimiento fue dejado de lado.

Presencia de una proteasa contaminante en la preparación de la fusión SPA-Ag1 expresada a partir de *S.aureus*. Análisis por SDS-PAGE de: 1, proteína recientemente producida, purificada e incubada a 37 °C, toda la noche en búffer fosfato 10 mM pH 8; 2, fusión dializada contra PBS y guardada durante un mes; 3, fusión dializada contra PBS y guardada durante dos meses. 4, fusión recientemente purificada, neutralizada con OHNa y sembrada inmediatamente.



F I G U R A 7 C

Eliminación de la proteasa contaminante. Análisis por SDS-PAGE de: 1, fusión purificada, neutralizada con OHNa y sembrada inmediatamente; 2, fusión repurificada como se indicó e incubada a 37 °C durante toda la noche en búffer fosfato 10 mM pH 8. 3, fusión sin repurificar e incubada en iguales condiciones que en 2.



3) La degradación en *S.aureus* hospedador fue menor. Esto pudo deberse a que en el medio extracelular la concentración de proteasas es menor que en el medio intracelular. Esta menor degradación en *S.aureus* también fue descrita en la expresión de la proteína "insulin-like growth factor 2" (IGF-2) fusionada a SPA, en comparación a *E.coli* (Nilsson y col, 1990).

Por lo tanto a partir de este punto, todas las fusiones fueron preparadas usando como hospedador *S.aureus*.

6.5 - OBTENCION DE LA PROTEINA LIBRE DE SPA

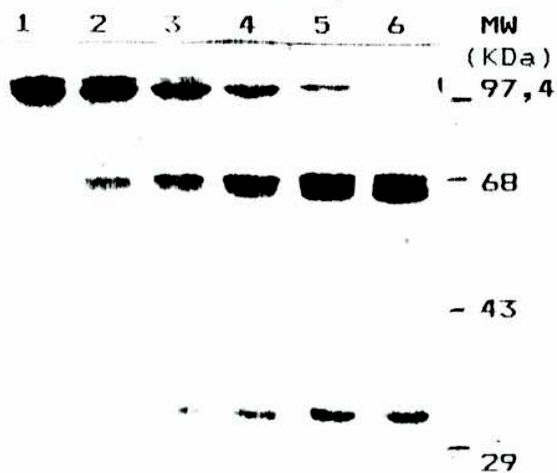
Si el Ag ha de emplearse como reactivo de diagnóstico, la eliminación de la SPA en la fusión es esencial ya que todo suero humano reaccionaría positivamente a través de esta.

6.5.1- TRATAMIENTO CON ENTEROPEPTIDASA

Se han tratado 10 ug de proteína fusión con cantidades variables de la Ep en las condiciones descritas en la sección 4.5. La figura 8A muestra que el clivado produjo dos fragmentos protéicos bien definidos, uno de peso molecular de 31 KDa y otro de 67 KDa. La cantidad de enzima necesaria para proteolizar totalmente a la fusión estuvo en el rango de 0,025 a 0,05 unidades/ug de proteína. Es importante notar que un exceso de enzima degradó al Ag debido a una posible actividad proteolítica extra en la preparación enzimática comercial. El proveedor (Sigma, USA) declaró la presencia de

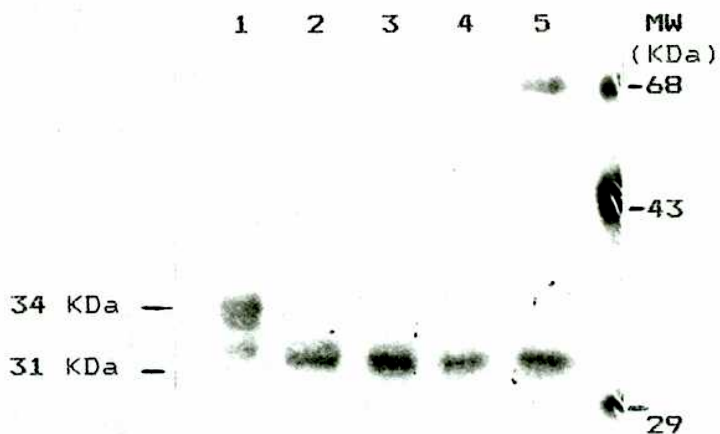
FIGURA 8A

Análisis por SDS-PAGE de los productos de proteólisis específica, con cantidades crecientes de enteropeptidasa, de la fusión SPA-Agl. Todas las calles corresponden a muestras constituidas por 10 ug de proteína en un volumen de reacción de 20 ul en búffer fosfato 10 mM pH 8 a 37 °C toda la noche. 1. fusión sin enzima; 2, 0,03 Us; 3, 0,06 Us; 4, 0,125 Us; 5, 0,25 Us; 6, 0,50 Us; MW, patrón de pesos moleculares. La preparación comercial contiene albúmina (68 KDa) corriendo en forma parecida al antígeno libre de SPA



F I G U R A 8 B

Análisis por SDS-PAGE de la SPA producida por *S.aureus* transformado con pRIT11, purificada por afinidad y tratada con enteropeptidasa. Todas las calles fueron sembradas con muestras constituidas por 5 ug de proteína en un volumen de reacción de 20 ul en las condiciones ya descritas (sección 4.5). 1, SPA sin tratamiento; 2-5, SPA tratada con 0,015 unidades (Us); 0,031 Us; 0,062 Us y 0,125 Us. MW, patrón de peso molecular.

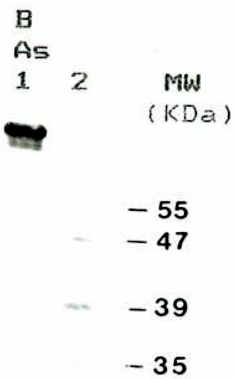
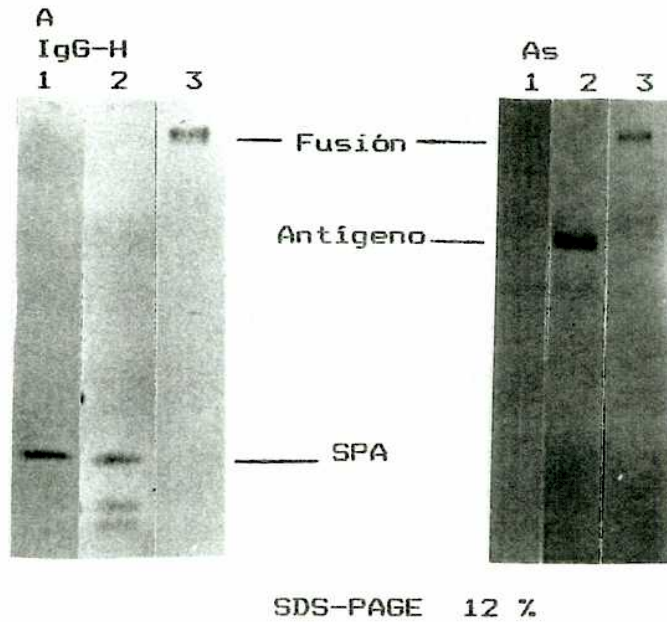


tripsina en un valor que no excede el 5%, por lo tanto la proteólisis inespecífica probablemente se debió a la presencia de sitios sensibles a esta enzima. Por otra parte, la existencia de una secuencia similar a la de reconocimiento de la enteroquinasa en la unidad de repetición, Leu(Asp)₃Ser, pudo ser sustrato de la Ep cuando esta se encontró en exceso. Las diferencias entre los pesos moleculares de estos fragmentos (figura 9A, parte B) fueron de aproximadamente 4 KDa o múltiplos de este valor y puesto que la distancia entre los sitios Leu(Asp)₃Ser, en la proteína es de 7 KDa, dicha degradación podría deberse mas bien a la tripsina u otra enzima contaminante en la preparación enzimática comercial. La figura 8B (pag 92) muestra que el tratamiento de la SPA sin fusionar a partir de *S.aureus* transformada con pRIT11 da el mismo peso molecular que la banda menor de la figura 8A, con una diferencia respecto a la proteína sin tratar de 3 KDa. Esto indica que la señal de terminación de la traducción se encuentra aproximadamente a unas 80 bases "rioabajo" del sitio de clivado de la enteroquinasa.

Con el fin de establecer la identidad de ambos fragmentos, estos fueron nuevamente separados por SDS-PAGE por duplicado, electrotransferidos a un filtro de nitrocelulosa y tratados como se indicó en la sección 5.5. Un filtro se usó para visualizar la parte antigénica y el otro para visualizar la SPA. La figura 9A muestra que el fragmento de 67 KDa corresponde al Ag 1 libre de SPA, mientras que en el filtro tratado con IgG-H, esta banda no se vió. De forma

FIGURA 9A

Análisis por Western blot de los productos de proteólisis con enteropeptidasa. A: 0,5 Us/10 ug de fusión, revelado con IgG-H o con antisuero de conejo (As); 1, 40 ng de SPA de *S.aureus* transformado con pRTI11 y digerido con enteropeptidasa; 2, 40 ng de fusión tratada con la misma enzima; 3, 20 ng de fusión sin tratamiento. B, 2,0 Us/10 ug de fusión revelado con antisuero específico de conejo; 1, 40 ng fusión sin tratamiento; 2, 40 ng de fusión con tratamiento.



SDS-PAGE 15%

análoga, la banda de 31 KDa correspondió a la SPA cuyo peso molecular fue idéntico con la SPA libre previamente tratada con Ep.

De esta forma quedó establecido que la proteólisis específica separó, en forma eficiente, ambas partes de la fusión.

6.5.2.- ULTERIOR PURIFICACION DEL ANTIGENO

La obtención del Ag libre tanto de la SPA como de los restos de fusión sin clivar, se realizó por un segundo pasaje de esta mezcla de productos por la columna de cromatografía de afinidad. Tanto la fusión como la SPA libre quedarían retenidas mientras que el Ag libre de SPA sería rescatado en el efluente.

Luego de tratar 5 mg de proteína fusión con 100 unidades de enteroquinasa, en iguales condiciones del experimento anterior, la mezcla fue pasada 3 veces por la columna para asegurar la total retención de la SPA en la matriz de IgG-Sepharosa. Después de eluir a pH 3,4; ambas fracciones (efluente y eluido) fueron chequeadas según su contenido por *Western blot* de igual manera que en el experimento anterior con excepción de no bloquear con IgG-H el filtro que posteriormente fue incubado con As específico de conejo. Los resultados expuestos en la figura 9B demuestra que el pasaje de la columna elimina la SPA en un grado no detectable por este método (la sensibilidad de esta técnica para la detección de SPA fue del orden de los 15 ng, ver calle 4). En el eluido

FIGURA 9B

Análisis por Western blot de los productos del tratamiento con enteropeptidasa después de la segunda separación por cromatografía de afinidad IgG-Sepharosa.

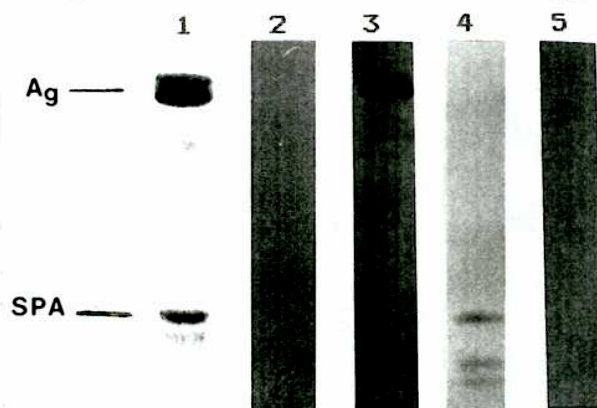
1: 10 ug de la fusión proteolizada con enteropeptidasa analizada por SDS-PAGE y teñido con azul de Coomassie.

2: Western blot de 50 ng de proteína presente en el efluente, revelado con IgG-H.

3: Igual que en 2 pero revelado con antisuero de conejo y sin bloquear con IgG-H.

4: Western blot de 40 ng de proteína presente en el eluido, revelado con IgG-H.

5: Igual que en 4 revelado con antisuero específico de conejo y bloqueado con IgG-H.



pudo rescatarse la SPA libre la cual fue retenida por la columna.

El alto fondo en los filtros de las calles 2 y 3, se debió a que se ha "forzado" la visualización de la banda correspondiente a la SPA, dejando transcurrir la reacción de color durante toda la noche. Pese a esto, no se detectó SPA en el efluente.

Se realizó un ensayo alternativo de Dot blot en nitrocelulosa, para chequear la presencia de SPA en el efluente. La metodología fue la descrita en la sección 5.4. con la diferencia de haber usado el efluente de la columna de IgG-Sepharosa y no un extracto o un sobrenadante. El resultado obtenido (figura 10) muestra la ausencia de SPA en el efluente, respecto a la sensibilidad del método (2 ng). Por lo tanto no se podría atribuir la no visualización de SPA en la calle 2 de la figura 9B (pag 96) a un problema en la electrotransferencia en el Western blot.

El rendimiento final fue de 2,45 mg de Ag/5 mg de fusión, es decir 7 mg por litro de cultivo. Cabe señalar que este fue un poco menor a la esperada, esto es: $(52/52+31) \times 5 \text{ mg} = 3.1 \text{ mg de Ag/5 mg de fusión}$, es decir, 8,7 mg de Ag por litro de cultivo. Esto pudo deberse a una degradación producida durante el tratamiento con la Ep. Además, el clivado no necesariamente es total ocasionando, en estos casos una pérdida en la recuperación.

Todo el procedimiento para este antígeno, fue relativamente eficiente y muy rápido.

FIGURA 10

Análisis por Dot-blot de la muestra perteneciente a la figura 9B calle 3. La misma corresponde al efluente la columna de afinidad IgG-Sepharosa, revelado con antisuero específico de conejo (A) y con IgG humana (B). El esquema de abajo indica la posición y cantidad de proteína sembrada.



| | | | |
|-------------------------------|----|-----|-----|
| SPA (ng) -- | 10 | 2,0 | 0,5 |
| Proteína del Efluente (ng) -- | 10 | 2,0 | 0,5 |

6.6 - PRODUCCION DEL ANTIGENO 30

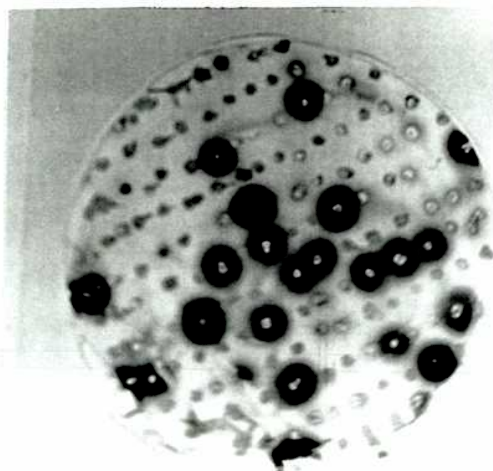
Siguiendo el mismo esquema de trabajo del Ag1, se continuó con el Ag30. El fragmento de ADN se subclonó en el sitio *EcoRI* del vector pRIT11, los clones positivos se identificaron por rastreo inmunológico (figura 11A, pag 100) y sus contenidos plasmídicos fueron también estudiados (figura 11B, pag 101). La positividad en la expresión fue posteriormente confirmada por Dot blot (figura 11C, pag 102). El plásmido recombinante, pI30, fue introducido en *S.aureus* SA113 siguiendo la misma metodología que en el caso anterior. La expresión y purificación, a nivel preparativo, se realizó de la misma forma que en el 1, obteniéndose resultados muy parecidos. Si bien la cantidad de proteína fusión fue inferior respecto al Ag 1, esta no fue extremadamente baja: 9 mg/l de cultivo. Los ensayos de proteólisis específica con enteropeptidasa, mostraron que las cantidades de enzima requeridas fueron aproximadamente iguales al caso anterior (figura 11D, sección A, pag 103).

Luego de tratar 5 mg de proteína con 100 unidades de Ep, en iguales condiciones, el Ag fue purificado a partir de la mezcla de los productos obtenidos de igual manera que el Ag 1 (figura 11D, sección B).

100

F I G U R A 11 A

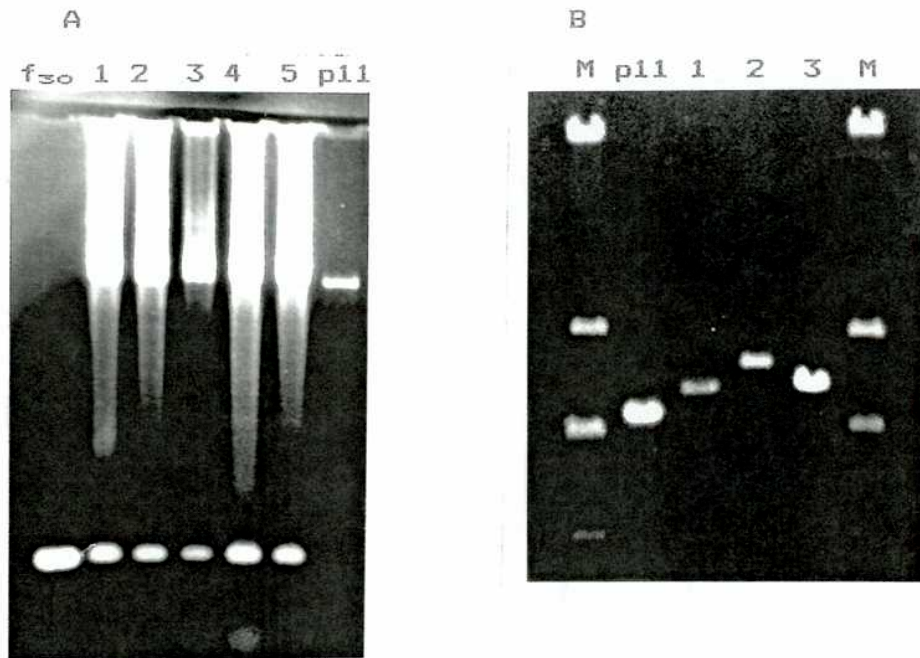
Subclonado y expresión del antígeno 30 en el sitio *EcoRI* del pRIT11. A, rastreo inmunológico una réplica de placa a partir de la placa madre de transformación. 5 clones positivos fueron rescatados a partir de la otra réplica para su posterior estudio



F I G U R A 11 B

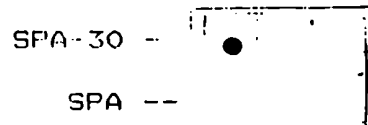
A: Cinco clones positivos picados de la otra placa cuyos plásmidos fueron analizados por restricción con *EcoRI* y electroforesis en gel de agarosa 1%: f_{30} , fragmento del antígeno 30 purificado por electro-elución; 1 al 5, clones con señal positiva; p11, pRIT11 digerido con *EcoRI*.

B: Tres de los cinco clones digeridos con *SaII* (todos poseen un solo sitio) y analizados por electroforesis en gel de agarosa 0,5% : M, ADN de fago lambda digerido con *HindIII*; p11, pRIT11 digerido con *EcoRI*; 1 al 3 tres de los cinco clones de la figura B. El clon 1, llamado posteriormente pI30, posee un fragmento en el vector, mientras que el 2 corresponde a un dímero, el cual fue descartado.



F I G U R A 11 C

Análisis por Dot-blot del extracto preparado a partir de *E. coli* transformada con pI30 (SPA-30). Un extracto preparado a partir de *E. coli* transformada con pRIT11 (SPA) fue usado como control. El esquema inferior muestra la cantidad de proteína total sembrada y su respectiva posición en el filtro

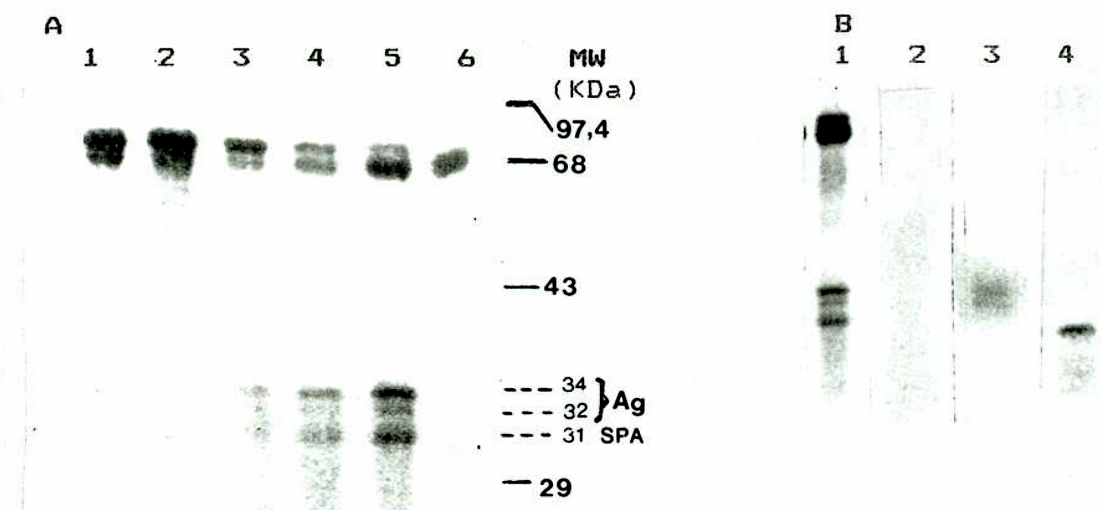


| | | | |
|--------------------------------|----|---|---|
| Proteína total de SPA-30 (ng)- | 10 | 5 | 1 |
| Proteína total de SPA (ng) - | 10 | 5 | 1 |

F I G U R A 11 D

A: Análisis por SDS-PAGE de los productos de proteólisis específica de la fusión SPA-Ag30 con enteropeptidasa, realizada en iguales condiciones que para la fusión SPA-Ag1. Cada calle fue sembrada con una muestra constituida por 10 ug de fusión y cantidades crecientes de enzima. 1, fusión sin tratamiento; 2, 0,06 Us; 3, 0,125 Us; 4, 0,25 Us; 5, 0,5 Us; 6, 1 Unidad de Enzima sin sustrato, la banda mayoritaria es albúmina presente en la preparación comercial. MW, patrón de peso molecular.

B: Análisis por Western blot del antígeno 30 purificado por columna de afinidad IgG-Sepharosa después del tratamiento enzimático. 1, 10 ug de la fusión digerida con enteropeptidasa analizados por SDS-PAGE y teñido con azul de Coomassie. 2, 50 ng de proteína presente en el efluente revelado con IgG-H; 3, igual que en 2 revelado con antisuero específico de conejo (As) sin previo bloqueo con IgG. 4, 40 ng de proteína presente en el eluido revelado con IgG-H;



La siguiente tabla resume la productividad de antígeno puro para el 1 y el 30, por litro de cultivo y la recuperación respecto a los valores teóricos.

| Fusión | Cantidad producida (mg de fusión/l) | Ag libre mg/l | Recuperación (m.o./m.e.)x 100 |
|----------|--|------------------|----------------------------------|
| SPA-Ag1 | 14 | 7 | 80,5 % |
| SPA-Ag30 | 9 | 2,16 | 77 % |

m.o.: masa observada. m.e.: masa esperada

Estos valores podrían ser aumentados, aproximadamente 2 veces si la producción se realizara en un fermentador con las condiciones optimizadas (Nilsson y col 1991). Por otro lado si la degradación no es considerada importante, como podría ser el caso de estos antígenos ya que están constituidos por unidades de repetición, podrían realizarse fermentaciones a tiempos largos (por ejemplo 12 hs) ya que como es un sistema constitutivo, la productividad de la SPA "acompaña" a la densidad óptica del cultivo (Anderson & Bailey, 1989) lográndose una mayor cantidad de proteína fusión. La recuperación podría mejorarse si las condiciones

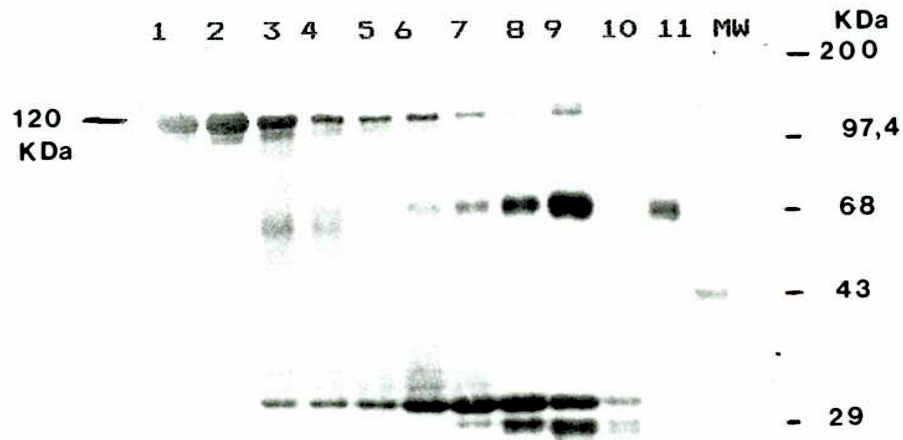
6.7 - PRODUCCION DEL ANTIGENO 13

El procedimiento empleado en este caso fue idéntico a los anteriores. El plásmido recombinante, pA13, fue introducido a *S.aureus* por el método de Chang & Cohen. La fusión se expresó y purificó como en los casos anteriores, rindiendo 6,5 mg/l de cultivo. El tratamiento de esta con Ep mostró hidrolizar el fragmento correspondiente al Ag en una concentración enzimática tan baja que no alcanzó a consumir el sustrato (ver figura 12A). Esto pudo ser debido a las siguientes causas.

- 1) El Ag 13 pudo corresponder a una proteasa propia del parásito, la cual es estable cuando se encuentra fusionada a la SPA. A medida que la Ep actúa liberándola, esta se activaría autodegradándose. Esta hipótesis perdió valor por la observación de que la SPA liberada no se degradó (ver figura 12A).
- 2) La presencia de una proteasa propia del hospedador que copurificó con el antígeno, pudo ser la responsable de esta degradación. Esta posibilidad fue también descartada ya que la incubación de la fusión en iguales condiciones (37 °C durante toda la noche en búffer fosfato 10 mM pH 8) sin la enzima, no la afectó (figura 12A)
- 3) En esta proteína, la unidad tiene 5 aminoácidos, la cual se repite mas de 30 veces. Cada unidad posee un sitio sensible a la tripsina y por lo tanto estos sitios son muy numerosos en toda la molécula, lo que la haría "hipersensi-

F I G U R A 1 2 A

Análisis por SDS-PAGE de la fusión SPA-Ag13 purificada y de la misma tratada con enteropeptidasa. Para la proteólisis, cada calle fue sembrada con una muestra constituida por 10 ug de proteína fusión y cantidades crecientes de la proteasa, en un volumen de 20 ul en las condiciones establecidas: 1, fusión guardada a -20 °C; 2, fusión incubada sin enzima; 3, 0,008 Us; 4, 0,015 Us; 5, 0,03 Us; 6, 0,06 Us; 7, 0,125 Us; 8, 0,25 Us; 9, 0,5 Us; 10, SPA tratada con la misma enzima; 11, 1 Unidad de enzima; MW, patrón de peso molecular.



ble" a esta enzima y como se mencionó anteriormente, la enteropeptidasa comercial, esta contaminada con esta.

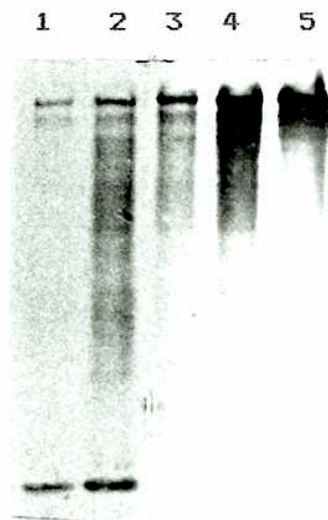
Una posterior incubación en presencia de un exceso de inhibidor de tripsina de clara de huevo (Sigma, USA) no mejoró la situación (figura 12B).

Para demostrar la segunda hipótesis o descartarla, el fragmento fue clonado y puesto en fase en el vector pRIT23 porque este posee un sitio de clivado para el factor Xa. La estrategia utilizada, es esquematizada en la figura 13A (páginas 109 y 110). Si bien pudo usarse otro método para la puesta en fase, este permitió obviar el uso de alguna exonucleasa que pondría en peligro la secuencia de reconocimiento del factor Xa.

El plásmido recombinante fue introducido a *S.aureus* por electroporación el que fue chequeado posteriormente con el fin verificar posibles deleciones ocasionadas en el proceso de transformación (figura 13B pag 111). En todos los casos de transformación por este método, no se vió ningún tipo de alteración en el plásmido una vez introducido en el huésped. La eficiencia de transformación por esta técnica resultó en 10^5 - 10^6 colonias transformadas por μ g de ADN plasmídico. La expresión de esta fusión en *S.aureus*, fue de igual magnitud que en el pRIT11 y también su peso molecular (figura 13C, pag 112). Una vez purificada, la fusión fue tratada con factor Xa siguiendo el método ya descrito. La presencia de una banda definida (ver figura 13D, pag 113), correspondiente al Ag demostró que seguramente el Ag13 es muy sensible a una

FIGURA 12 B

Análisis por Western blot del tratamiento con enteropeptidasa en presencia del inhibidor de tripsina de clara de huevo. La reacción fue realizada usando 10 ug de fusión, 10 ug de inhibidor y cantidades decrecientes de enzima en un volumen de 20 ul y en las condiciones ya establecidas. 100 ng correspondiente a la fusión tratada fueron sembrados en cada calle y el filtro se reveló con antisuero específico de conejo anti-13. 1, 0,5 Us; 2, 0,25 Us; 3, 0,125 Us; 4, 0,06 Us; 5, 0,03 Us. El bloqueo con IgG-H no fue del todo eficiente y por lo tanto puede visualizarse la SPA liberada por la reacción proteolítica.



F I G U R A 13 A

A: Estrategia de subclonado y puesta en fase del fragmento de ADN correspondiente al Ag 13 (f_{13}), desde el vector pRIT11 al pRIT23. B: Electroforesis en gel de agarosa 1% del f_{13} digerido con *Pst*I mostrando que este sitio se encuentra a unas 900 bases del extremo 5': 1, f_{13} sin digerir (2,2 Kb); 2, f_{13} digerido con *Pst*I; 3, pA13 digerido con *Pst*I; M, ADN de Fix174 digerido con *Hae*III.

A

Ubicación del f_{13} en el MCS del pRIT11 (pA13)

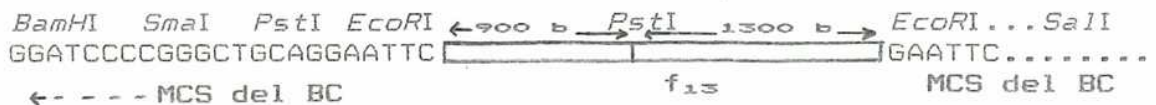
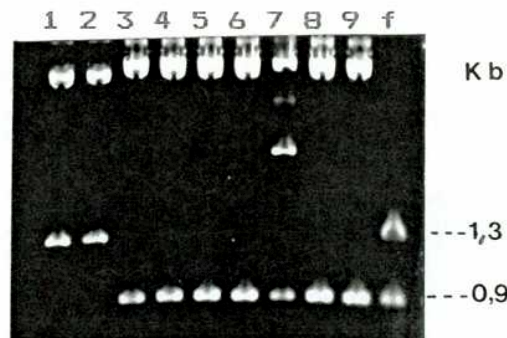


1) Digestión con *Eco*RI

2) Purificación del f_{13}
por electroelución

3) Subclonado en pBLUESCRIPT SK+ (BC) en el sitio *Eco*RI, transformación en *E. coli* JM101 e identificación de los clones recombinantes en agar L/ampicilina/X-gal/IPTG. (Sambrook y col, 1989).

Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de 9 plásmidos recombinantes digeridos con *Pst*I (1 al 9); f, f_{13} digerido con *Pst*I. Los clones 3, 4, 5, 6, 8 y 9 tienen la orientación deseada; 1 y 2, la inversa.



B

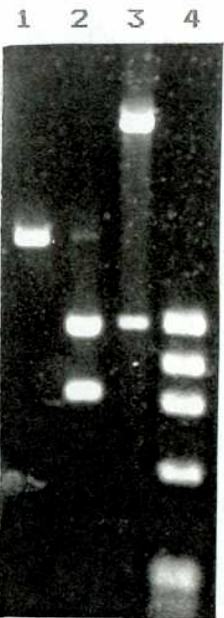
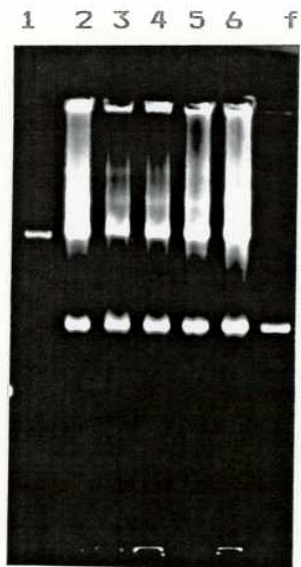


FIGURA 13B

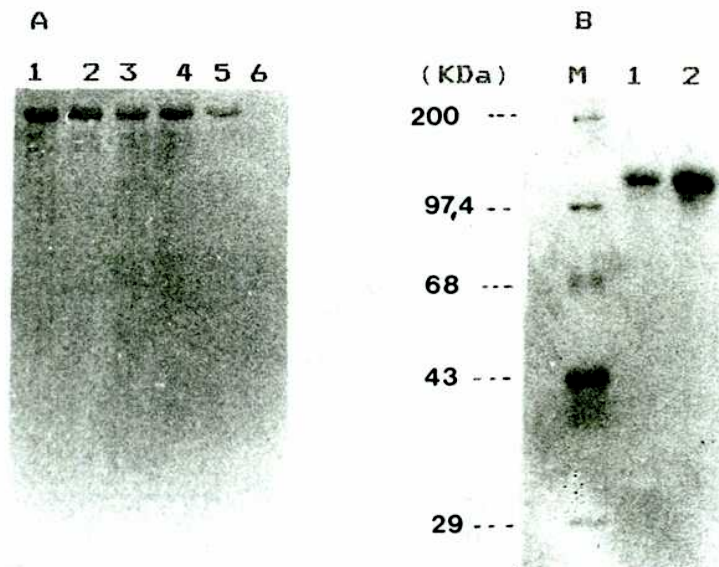
Análisis de los plásmidos recombinantes por electroforesis en gel de agarosa 0,8% y de la transformación, por electroporación de *S.aureus* con el pRIT23-f₁₃ (en fase). 1, pRIT23 digerido con *EcoRI*. 2, pA13 digerido con *EcoRI*. 3, f₁₃ en pRIT23 con la fase incorrecta, digerido con *BamHI/SalI*. 4, pRIT23-f₁₃ (en fase) digerido con *SmaI/SalI*. 5, el mismo plásmido digerido con *EcoRI*. 6, el mismo plásmido extraído de *S.aureus* y digerido con *EcoRI*. f, f₁₃.



F I G U R A 13 C

A: Análisis por Western blot de extractos de cuatro clones de *E.coli* positivos (1 al 4) revelado con antisuero específico de conejo; 5, extracto de *E.coli* transformada con pA13 (f_{13} en pRIT11); 6, extracto de *E.coli* transformada con pRIT11.

B: Análisis por SDS-PAGE 10% de las fusiones SPA-Ag13 en pRIT11 (1) y en pRIT23 (2) producidas en *S.aureus* y purificadas según la rutina. M, patrón de peso molecular.

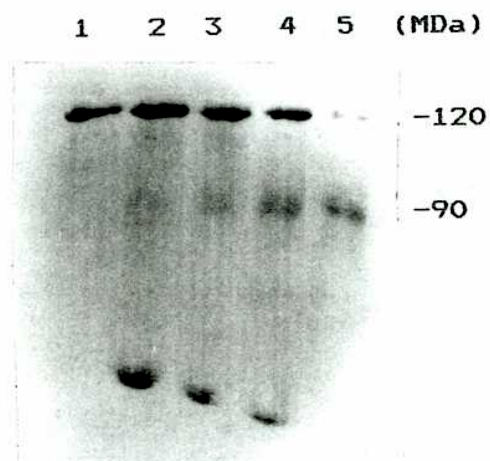


F I G U R A 13 D

Análisis por Western blot de los productos de proteólisis de la fusión SPA-Ag13 en pRIT23 con distintas cantidades del Factor Xa. Cada calle fue sembrada con 100 ng de proteína clivada a partir de muestras constituidas por 10 ug de proteína fusión en presencia de:

1: 0 ng; 2: 61 ng; 3: 125 ng; 4: 250 ng; 5: 500 ng de enzima. Las condiciones de reacción fueron las descritas en Materiales y Métodos.

El filtro fue revelado con antisuero específico de conejo cuyo bloqueo con IgG-H no fue total y por lo tanto puede visualizarse la SPA liberada.



proteasa contaminante, aunque no se pudo establecer si la tripsina presente en la preparación comercial, fue la responsable de la degradación puesto que la proteólisis en presencia del inhibidor no la impidió. Está descrito que todas las proteasas comerciales casi siempre llevan consigo este tipo de contaminación (Ford & Glatz 1991).

Si bien el factor Xa produjo el antígeno libre de SPA sin presentar degradación, la proteólisis no fue muy eficiente comparada a los resultados obtenidos por Smith y Johnson (Smith & Johnson, 1988) en la proteólisis con esta enzima con fusiones de GST con el Ag16 de *P.falciparum*, (Bianco y col, 1986), cuyo peso molecular calculado fue de 20 KDa. En este caso una relación enzima/sustrato de 1/100 logró la proteólisis total, mientras que en este caso particular, una relación de 5/100 no logró la proteólisis total. Posiblemente el tamaño de nuestro Ag13 (90 KDa "aparentes") hizo que el acceso de la enzima a su sitio de reconocimiento se vea impedido por algún tipo de "enmascaramiento".

La SPA aparece en este último Western debido a un bloqueo parcial del filtro con la IgG-H y puede verse su desaparición en el punto correspondiente a la mayor cantidad de la enzima, la que pudo deberse a una actividad enzimática extra. Esto no sería importante ya que al final del procedimiento la SPA debe ser removida.

Por lo tanto, se necesitarían, para estos dos tipos de fusiones, preparaciones de enteropeptidasa libres de tripsina u otras proteasas contaminantes o bien preparaciones de

factor Xa de mayor actividad específica. El clivado químico, como ser el tratamiento de la fusión con Li/metilamina/N-bromosuccinimida (Wilchek & Patchornik, 1962) el cual corta donde hay Phe (el segundo aminoácido del antígeno en la fusión) sería inseguro puesto que el gran tamaño de este Ag haría probable la presencia de múltiples sitios sensibles. Téngase en cuenta que la secuencia nucleotídica de este antígeno fue incompleta, teniéndose a disposición la correspondiente al extremo 5' la cual representa un 20% del total.

6.8 - PRODUCCION DEL SAPA

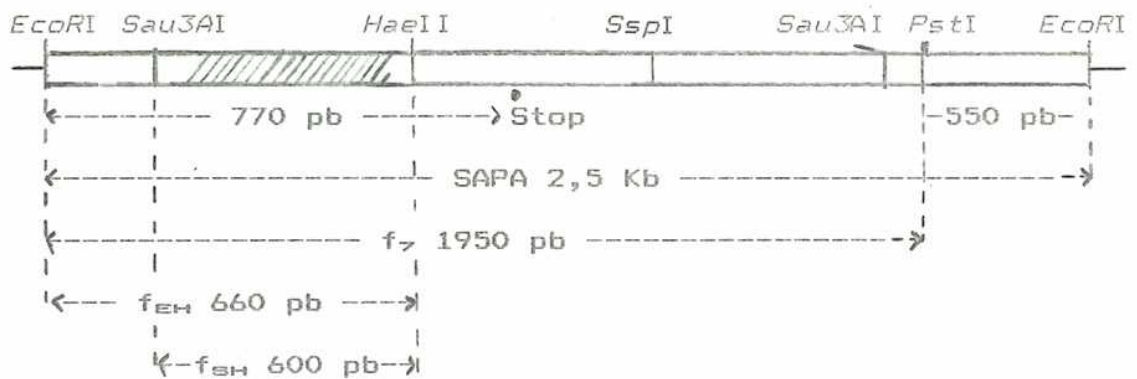
El fragmento inicial de este Ag presentó una dificultad para la electroelución ya que este tiene un peso molecular semejante a su vector pUC19 (2,5 Kb y 2,6 Kb respectivamente) y en todas las preparaciones siempre apareció este último como contaminante. Si la señal de terminación de la traducción se encuentra entre el sitio *HaeII* y *SspI*, puede eliminarse el fragmento comprendido entre el sitio *PstI* y *EcoRI* (ver figura 14A), logrando un tamaño menor de forma tal de facilitar la electroelución. Por lo tanto el fragmento a subclonar comprendió desde el extremo 5' *EcoRI* hasta el sitio *PstI* 3' (f₂) el cual fue insertado en los mismos sitios del pRIT11. Luego se procedió de igual forma que en los casos anteriores (figura 14A sección B).

La expresión de la fusión. en *S.aureus* resultó en una excesiva degradación. Esta, fue cosechada en la fase

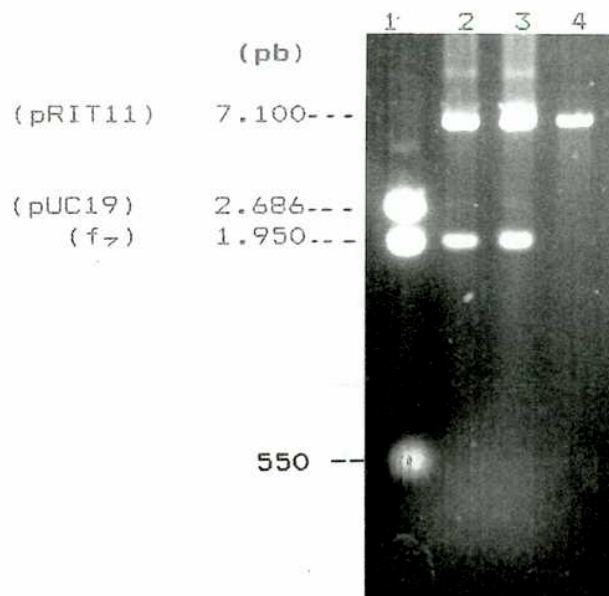
FIGURA 14A

A: Esquema del fragmento de ADN correspondiente al SAPA señalando los sitios de restricción más representativos, la nomenclatura de los fragmentos y la ubicación de la señal de terminación de la traducción. La zona sombreada indica la ubicación del motivo de secuencia repetida. B: Electroforesis en gel de agarosa 0,8% mostrando el subclonado del inserto *EcoRI*-*PstI* (f_z) en pRIT11 y transformación de este plásmido en *S.aureus*: 1, fragmento SAPA en pUC19 digerido con *EcoRI*/*PstI*. 2, pRIT11 con el inserto; de *E.coli* digerido con *EcoRI*/*PstI*. 3, el mismo plásmido a partir de *S.aureus*. 4, pRIT11 digerido con *EcoRI*.

A



B



estacionaria temprana del cultivo, donde aumentaría la expresión de las proteasas del huésped. Por esta razón, se realizó una fermentación a distintos tiempos en iguales condiciones, con excepción de un aumento en el inóculo a 10% en vol/vol, con el fin de obtener una masa de proteína considerable en los primeros tiempos. Luego de la purificación por afinidad a partir de los sobrenadantes correspondientes a cada tiempo, se analizaron las muestras por SDS-PAGE. En todos los tiempos se observó una alta actividad proteolítica (figura 14B, pag 119) nunca vista en los antígenos anteriores. La fermentación en presencia de PMSF 1 uM no mejoró la estabilidad (figura 14B). Es posible que el alto inóculo haya contribuido a una mayor actividad proteolítica, ya que fue el primer caso en que se lo aumentó. A continuación se detalla la rutina de trabajo:

Fermentación a distintos tiempos

| Tiempo de fermentación (hs) | Volumen de medio cosechado (ml) | Proteína total recuperada (mg) | Proteína por l. de cultivo (mg/l) |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1,5 | 300 | 0,24 | 0,8 |
| 3,0 | 200 | 0,31 | 1,55 |
| 4,5 | 100 | 0,41 | 4,1 |
| 6,0 | 50 | 0,435 | 8,7 |

Fermentación de 3 hs a distintas concentraciones de PMSF

| Concentración de PMSF (uM) | Volumen de medio cosechado (ml) | Proteína total recuperada (mg) | Proteína por l.de cultivo (mg/l) |
|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 0,12 | 120 | 0,144 | 1,2 |
| 0,25 | 120 | 0,11 | 0,91 |
| 0,50 | 120 | 0,08 | 0,66 |
| 1.0 | 250 | 0,06 | 0,24 |

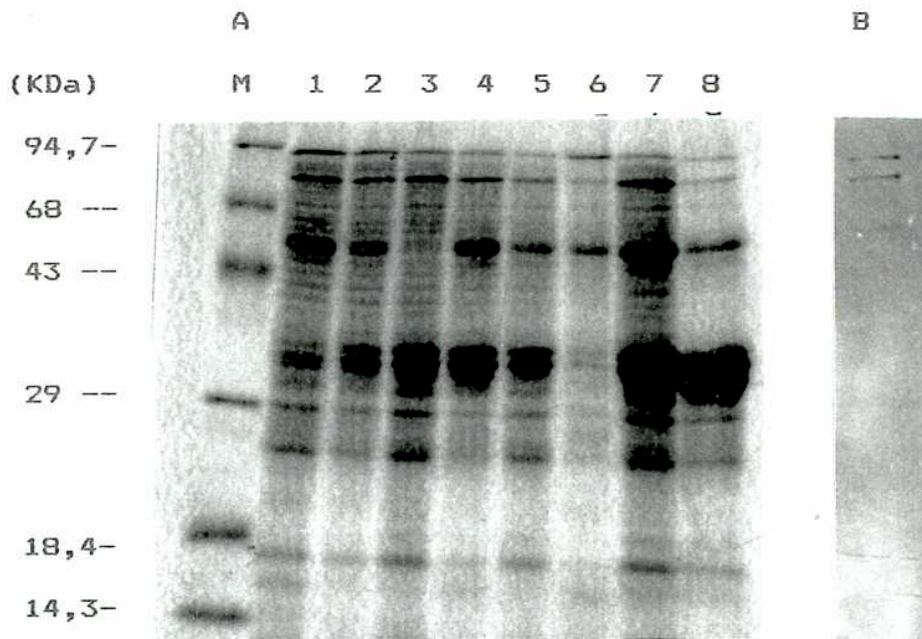
La figura 14B muestra además el *Western blot* en que las bandas de peso molecular aparente, 95/80 KDa, corresponden a la verdadera fusión aunque son minoritarias. La mayor parte se encontró en la zona correspondiente a la SPA dando indicios de una degradación específica. Este tipo de clivado por el hospedador fue ya descrito en la expresión de IGF-1 fusionado a SPA en *E.coli* (Nilsson y col, 1985a) donde una zona de ruptura se localizó entre las dos mitades de la fusión. Un problema similar se presentó en la expresión de IGF-2 fusionado a SPA en *E.coli* (Nilsson y col 1991). En ambos casos la degradación fué menor cuando el hospedador fue *S.aureus*. Con respecto al SAPA, la ruptura de la fusión se dió tanto en *E.coli* como en *S.aureus*.

Téngase en cuenta que en *S.aureus* el sistema es constitutivo y que no se disponen de ningún tipo de vectores inducibles.

F I G U R A 1 4 B

A: Análisis por SDS-PAGE 12% de los productos de expresión de la fusión SPA-SAPA (f_{\rightarrow}) purificados por afinidad. Cada calle fue sembrada con 10 μ g de proteína. M, patrón de peso molecular. 1 al 4: 1,5 hs; 3 hs; 4,5 hs y 6 hs de fermentación respectivamente. 5 al 8: fermentación durante 3 horas en presencia de 0,12; 0,25; 0,5 y 1 μ M de PMSF respectivamente.

B: Análisis por Western blot de 100 ng de la muestra correspondiente a la calle 8, revelado con antisuero específico de conejo.



6.8.1 - MODIFICACIONES EN EL ADN

Si existe una zona de ruptura, un alejamiento entre la SPA y el SAPA dentro de la fusión por una intercalación de otra proteína "trasladaría" la zona de ruptura la que se daría entre esta proteína y el SAPA (ver esquema de la figura 14A pag 116). La proteína elegida para tales fines fue el Ag 1 ya que esta además de no degradarse, conserva el mismo marco de lectura en su extremo 3'.

El pRIT11 con el inserto f_7 fue digerido con *EcoRI* (ver figura 14A pag 116), y el fragmento de ADN del Ag1 (f_1) se insertó en este sitio de forma tal de obtener una triple fusión SPA-Ag 1-SAPA. Los clones obtenidos de la placa madre, fueron identificados por rastreo inmunológico usando As-anti-1 y los clones positivos fueron rechequeados por Dot blot para la expresión del Ag 1 y SAPA por separado. La figura 15A muestra la presencia de una legítima fusión entre el 1 y el SAPA. El plásmido recombinante, pS1, fue analizado según sus insertos e introducido en *S.aureus* RN4220 por electroporación (figura 15B pag 122) y la triple fusión fue expresada durante un tiempo de 3 horas. El sobrenadante de esta fue analizado por Western blot revelado con IgG-H (figura 15C pag 123). Si bien la zona de ruptura se "trasladó" sugiriendo una vez mas que el sitio de corte se encontró en las proximidades del extremo N-terminal del SAPA, las bandas mayoritarias de degradación (a nivel SPA) se conservaron sumándose otras.

La producción de esta proteína, en esta forma, no puede efectuarse ya que hace disminuir significativamente el

FIGURA 15 A

Análisis por Dot blot de extractos de 10 clones independientes de *E.coli* obtenidos en el ensayo descrito en el texto y el sobrenadante de dos clones de *S.aureus* transformados con el mismo plásmido. En el esquema inferior se muestra la ubicación de cada clon y los respectivos controles.

Revelado con
As anti-1

0
0

Revelado con
As anti-Sapa

●
○ ● ○ ○ ○
○ ○ ○ ●
○ ○

Esquema general

| A | B | C | D | E |
|----|----|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 11 | 12 | - | - | - |

A: 10 ng de fusión SPA-SAPA. **B:** 10 ng de fusión SPA-Ag1. **C:** 10 ng de SPA purificada. **D:** 50 ng de proteína de extracto de *E.coli* transformada con pRIT11. **E:** 50 ng de extracto de *E.coli* sin transformar. del 1 al 12: 12 clones recombinantes independientes.

F I G U R A 15B

Análisis por electroforesis en gel de agarosa 0,8% del plásmido correspondiente a la triple fusión SPA-Ag1-SAPA a partir de *S.aureus* y *E.coli*:

M1, ADN de fago Lambda digerido con *Hind*III. M2, ADN de fago Fix174 digerido con *Hae*III (solo las tres bandas mas pesadas). 1, pJ34 pRIT11 (con el inserto Ag1) digerido con *Eco*RI. 2, pRIT11 con inserto f_{λ} digerido con *Eco*RI/*Pst*I. 3 y 5, pRIT11 con ambos insertos (pS1) digeridos con *Eco*RI/*Pst*I y extraídos a partir de *S.aureus* y *E.coli* respectivamente. 4, pRIT11 digerido con *Eco*RI.

M1 M2 1 2 3 4 5

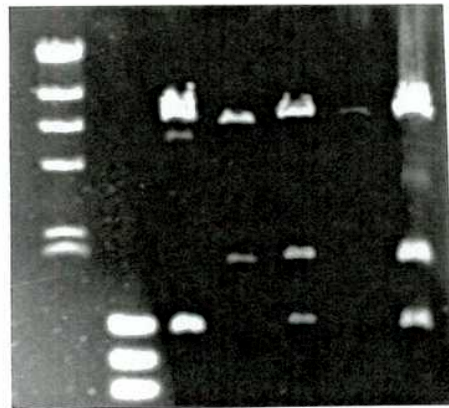
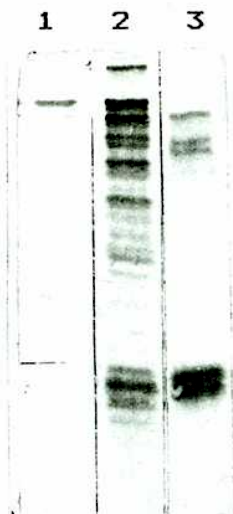


FIGURA 15 C

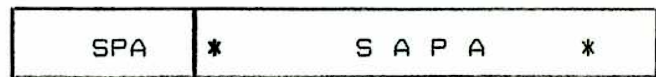
Western blot de sobrenadantes de *S.aureus* transformados con:

1, pJ34 (fusión SPA-Ag1). 2, pS1 (fusión SPA-Ag1-SAPA). 3, pRIT11 con el inserto f₇.

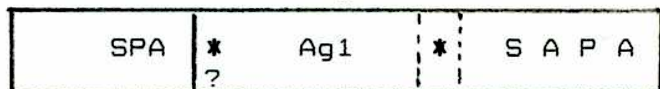
El esquema muestra las zonas donde se daría la ruptura en las fusiones con mas intensidad (*).



Fusion SPA-SAPA



Fusión SPA-Ag1-SAPA



rendimiento en la producción. Véase en la figura 14B, que la cantidad de proteína fusión auténtica es minoritaria con respecto al resto de las especies presentes luego de la purificación por afinidad.

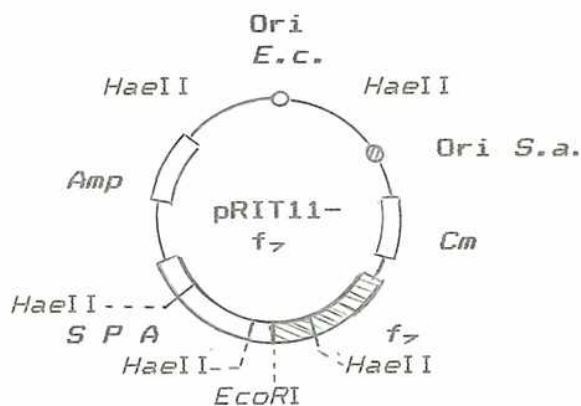
Como solución alternativa frente a este problema, se pensó que si el tamaño de la fusión fuese más pequeño, la degradación podría ser menor. A partir de esta suposición, se subclonó un fragmento menor que abarcó desde el extremo *EcoRI* 5' hasta el sitio *HaeII* (ver figura 14A, pag 116, ~~f_{2H}~~) eliminando gran parte de la zona hidrofóbica presente en el extremo 3' (ver figura 3D, pag 70), la que en principio no sería inmunológicamente importante (Buschiázco y col 1991) y según lo explicado en la sección 4.1 (última parte). La estrategia de subclonado se esquematizó en la figura 16A, páginas 125 y 126 (cabe señalar que el MCS del pRIT11 carece de sitio *HaeII*). El plásmido recombinante, pFEH, fue chequeado en 7 clones positivos por análisis de restricción e introducido por electroporación en *S.aureus* RN4220 ya que la cepa SA113 mostró ser incompetente por este método. Esta última también fue transformada con este nuevo plásmido por el método de Chang y Cohen, para controlar algún tipo de diferencia en la expresión con la primera.(figura 16B, pag 126).

Estas últimas dos cepas transformadas con el pFEH, fueron crecidas en paralelo con la SA113 transformada con el pRIT11-~~f₂~~ durante 2 hs, en las condiciones de rutina y con un inóculo de 1%. Los respectivos sobrenadantes fueron analizados por Western blot y el filtro fue revelado con IgG-H. Este ensayo

FIGURA 16 A

A: Esquema del pRIT11 con el fragmento f_7 mostrando la posición de los sitios *Hae*II. B, detalle de la estrategia empleada para el subclonado del fragmento f_{EH} en pRIT11. C: Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% del plásmido esquematizado digerido con *Hae*II. M1, ADN de fago lambda digerido con *Hind*III. M2, ADN de fago Fix174 digerido con *Hae*III. 1, pRIT11; 2 y 3, pRIT11- f_7 , los tres digeridos con *Hae*II. La flecha señala la posición del fragmento a electroeluir.

A

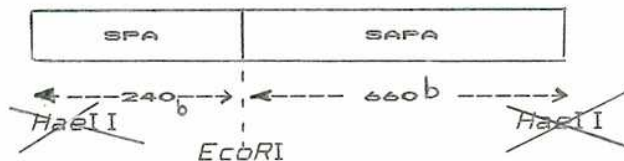


B

- 1) Restricción del pRIT11- f_7 con *Hae*II.
- 2) Electroelución del fragmento de 900 pb →



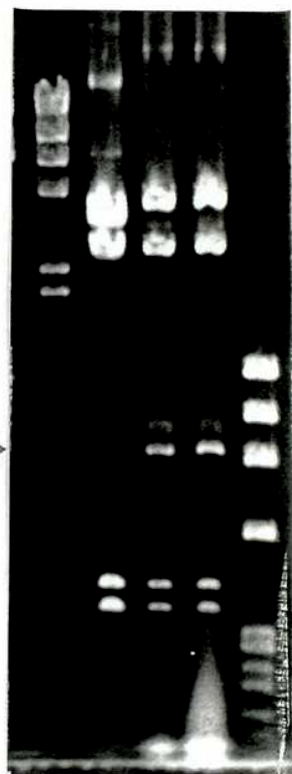
- 3) Tratamiento con exonucleasa *Mung Bean*, purificación con fenol cloroformo y precipitación con etanol.



- 4) Reparación de las presuntas puntas no romas debidas a una posible actividad exonucleolítica extra, con la enzima de Klenow en presencia de todos los NTP. Purificación con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.
- Continuación de la figura 16A

C

M1 1 2 3 M2

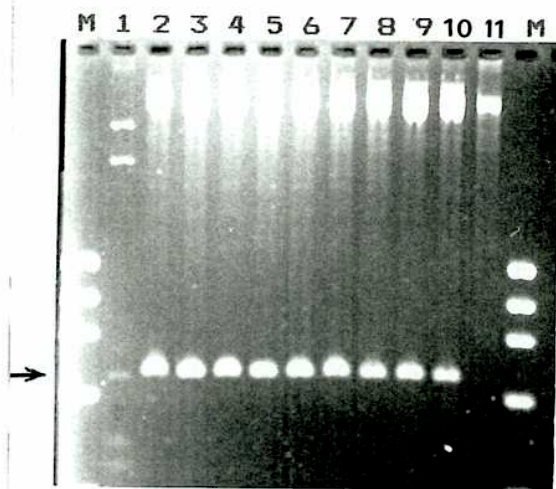


Continuación de la figura 16A

5) Digestión con *EcoRI*, ligación del producto a pRIT11 en los sitios *EcoRI/SmaI*; transformación e identificación de los clones positivos por rastreo inmunológico

F I G U R A 16B

Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % de nueve clones positivos. M, ADN de fago FiX174 digerido con *HaeIII*. 1, pRIT11-f₇ digerido con *HaeII/EcoRI*. 2 al 8, plásmidos a partir de siete clones positivos de *E.coli*. 9, el plásmido correspondiente a la calle 8 en *S.aureus* SA113. 10, el mismo en *S.aureus* RN4220 todos digeridos con *EcoRI/SalI*. 11, pRIT11 digerido con *EcoRI*. Este nuevo plásmido fue llamado pFEH.



mostró que la delección del fragmento en la zona 3' no mejoró significativamente la estabilidad (figura 16C) pero hizo desaparecer la banda mas pesada demostrando que donde se deletó (cerca del sitio *HaeII*) se encuentra, en la proteína, una de las zonas de ruptura. Por otro lado no se observó diferencias entre las cepas de *S.aureus* SA113 y RN4220. El mismo resultado fue obtenido en *E.coli* HB101.

Para descartar la posibilidad de una proteólisis durante la purificación, el medio de cultivo libre de células de *S.aureus* RN4220 transformada con pFEH y expresadas durante 3 horas, fue calentado a 100 °C durante 30 minutos inmediatamente después de la eliminación de las células, con el fin de inactivar las presuntas proteasas en el medio de cultivo. Luego de dejar renaturalizar la proteína durante 1 hora a temperatura ambiente, esta fue recuperada y purificada de la forma habitual. La degradación observada en el análisis de SDS-PAGE (figura 16D, sección A, pag 129) indicó que la ruptura se daría durante la expresión.

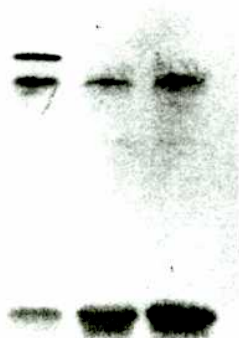
Otro parámetro que se estudió fue la temperatura (Uhlén, comunicación personal). La expresión fue llevada a cabo a 30°C; 35°C y 42°C mostrando efectos aún peores a la temperatura mas baja y equivalentes a 35°C o a 42°C (figura 16D sección B, pag 129).

La proteína expresada a partir del pFEH se degradó presentando mayoritariamente dos especies bien definidas: una correspondiente a la fusión con un peso molecular aparente de

FIGURA 16 C

Análisis por Western blot, revelado con IgG-H de, los sobrenadantes de *S.aureus* SA113 transformado 1: con pRIT11-f₇ (fusión SPA-SAPAF). 2: con pFEH (fusión SPA-SAPAH). Calle 3, sobrenadante de *S.aureus* RN4220 transformada por electroporación con el pFEH (SPA-SAPAH). En todos los casos se ha sembrado un volumen de 60 ul de medio de cultivo libre de células. El inóculo utilizado en este ensayo, fué 1% (1/100).

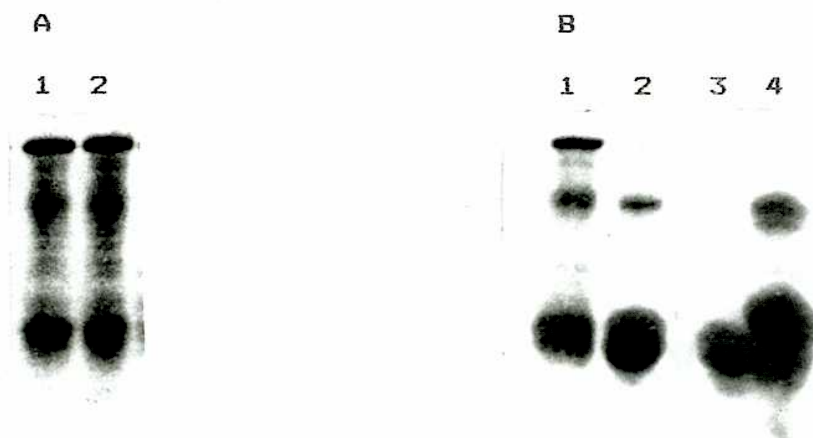
1 2 3



F I G U R A 16D

A: Análisis por SDS-PAGE 12% de la fusión SPA-SAPAH del medio de cultivo libre de células calentado a 100 °C antes de su recuperación y purificación por afinidad: 1 y sin calentar: 2

B: Análisis por SDS-PAGE de fusiones expresadas a diferentes temperaturas: 1, 37°C. 2, 35°C. 3, 30°C y 4, 42°C.



75 KDa y otra en la zona de la SPA de 32 KDa (figura 16E sección A) ambas presentes en la proteína producida por el pRIT11-f₇ (figura 16C, pag 128). Cuando esta población se trató con Ep, el fragmento menor de 32 KDa, adquirió un peso molecular de 31 KDa y correspondió a la SPA, mientras que el mayor de 75 KDa, desapareció para dar origen al Ag, con un peso molecular aparente de aproximadamente 45 KDa (figura 16E sección B y C) el que fue posteriormente purificado e identificado por Western blot (figura 17, pag 132).

La región de ruptura presente en el extremo N-terminal fue eliminada tomando ventaja de la existencia de un sitio único de corte *Sau3AI* en la posición 74 del f_{EH}. Este elimina los primeros 25 aminoácidos que incluyen una zona hidrofóbica y una hidrofílica (ver figura 3D, pag 70). El fragmento resultante, llamado f_{EH}, 600 pb, comprendió entonces desde el sitio *Sau3AI* del extremo 5' hasta el sitio *HaeII* del 3' (ver figura 14A, pag 116) y corresponde a la segunda zona hidrofóbica, una región hidrofílica y el motivo de secuencia repetida también hidrofílico (ver también figura 3C, pag 69).

El f_{EH} fue preparado a partir del pFEH. Este se digirió con *EcoRI* y *SaII* (el sitio *SaII* pertenece al MCS del vector y esta inmediatamente 3' del inserto) y el f_{EH} (de 660 pb) se purificó por electroelución. Una vez que el fragmento se trató con *Sau3AI*, dando el f_{EH}, se insertó en los sitios *BamHI* y *SaII* del pRIT22. El marco de lectura del sitio *BamHI* en este vector, es igual al del sitio *Sau3AI* en el fragmento.

F I G U R A 16 E

A: Análisis por SDS-PAGE 12% de la fusión SPA-SAPAH₁ (1) expresada en *S.aureus* y purificada por afinidad, en el que se muestra las dos formas predominantes. M, patrón de peso molecular.

B: Proteólisis específica con enteropeptidasa. Cada calle corresponde a muestras con 10 ug de fusión con cantidades crecientes de enzima en un volumen de 20 ul e incubadas en las condiciones ya establecidas. 1: 0 Us. 2: 0,03 Us. 3: 0,06 Us. 4: 0,125 Us. 5: 0,25 Us. 6: 0,5 Us.

C: Análisis por Western blot, revelado con IgG-H, de 100 ng de muestra sembrada correspondiente a la calle 6 de B. 1, fusión SPA-SAPAH₁ sin tratamiento. 2, fusión con tratada con enteropeptidasa. 3, SPA igualmente tratada. Cabe señalar que el fragmento menor de la calle 1 (32 KDa) disminuye su peso molecular luego del tratamiento igualándose al de la SPA, (31 KDa) en 1 KDa (aproximadamente 10 residuos).

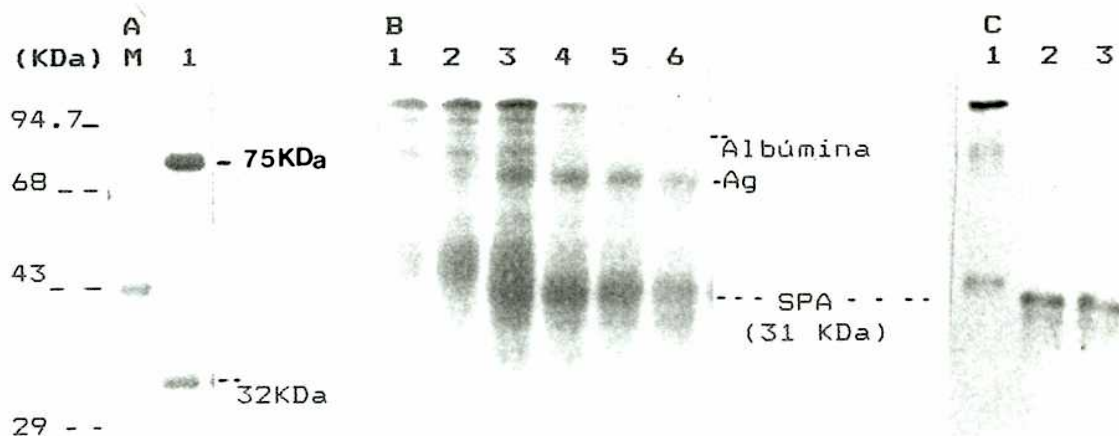
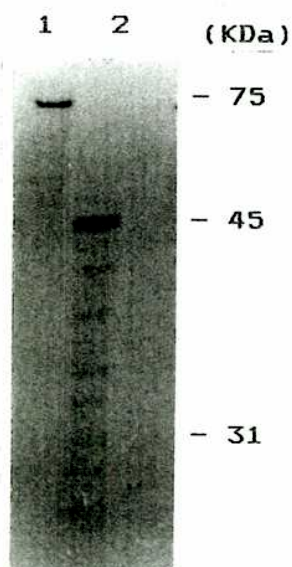


FIGURA 17

Análisis por Western blot de la proteína SAPA_H libre de SPA, revelado con antisuero específico de conejo **sin bloqueo con IgG-H.**

2 mg de proteína fusión fue tratada con 35 Us de enteropeptidasa en las condiciones establecidas. El antígeno se separó de la SPA ya sea libre como en la fusión remanente por un segundo pasaje por cromatografía de afinidad IgG-Sepharosa.

1: 30 ng de fusión sin tratar. 2: 50 ng de antígeno SAPA_H presente en el efluente.



Los clones positivos fueron identificados por rastreo inmunológico y confirmados por Dot blot. Luego de transformar con el plásmido recombinante, pFSH, a *S.aureus* RN4220 por electroporación, se analizó el producto de fermentación por SDS-PAGE. La figura 18 muestra que ahora la nueva fusión es estable aún en tiempos de crecimiento bacteriano tan largos como 16 horas. Esta nueva fusión ha sido expresada en niveles muy parecidos a la fusión SPA-Ag30 (9,4 mg/l de cultivo).

Los resultados que se han mostrado hasta ahora, demuestran que hay una región cercana al N-terminal del SAPA (de aproximadamente 10 a 15 aminoácidos) donde se encuentra el sitio de corte específico dado por hospedador o bien una zona de terminación temprana en la traducción.

La posibilidad de una terminación temprana se descartaría en primera instancia, puesto que todos los codones en esta región están presentes en la SPA y por lo tanto representados en los ARN de transferencia del hospedador. La formación de una estructura secundaria relativamente estable en el ARN mensajero que impida continuar la traducción también fue descartada puesto que por un lado no se la encontró y por otro, la expresión a 42°C, que podría desestabilizarla, no cambió el patrón de ruptura.

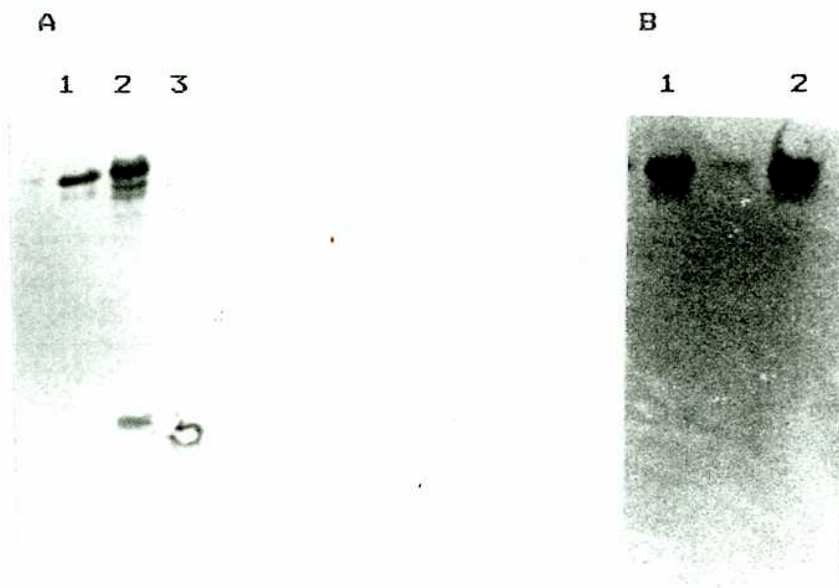
Algunas observaciones apoyan la posibilidad de que la hidrofobicidad en este sistema, tenga un rol importante:

1) Los Ags 1; 30 y lo conocido del 13 son hidrofílicos, aunque presentan pequeñas zonas hidrofóbicas y estas no se degradan durante la expresión.

FIGURA 18

A: Análisis por SDS-PAGE 12% de la fusión SPA-SAPAs (pFSH) expresado en *S.aureus* RN4220 y purificada según la rutina. 1, 3 ug de SPA-SAPAs. 2, 6 ug de SPA-SAPAs. 3, 3 ug de SPA.

B: Análisis por SDS-PAGE 12% de la fusión expresada en *S. aureus* durante tiempos largos. Cada calle fue sembrada con 5 ug de proteína fusión producida en 7 hs, calle 1; y 16 hs. Calle 2.



2) Cuando la SPA se fusionó con otro antígeno de *T.cruzi*, el 2, se observó una degradación análoga las fusiones correspondientes a los f₇ y f_{EH}. Esta proteína presenta dos zonas: una correspondiente a la repetición, la que comienza inmediatamente después de la SPA (en la fusión) cuya unidad presenta una región hidrofóbica importante. La otra región es altamente hidrofóbica y se extiende hasta el extremo C-terminal (figura 19). Cuando esta fusión se expresó tanto en *S.aureus* como en *E.coli*, se observó la presencia de una banda a nivel de SPA y otra muy difusa de peso molecular mayor (ver figura 19 sección C) la cual es mucho menor que la esperada (cabe señalar que las demás fusiones presentaron bandas cuyos pesos moleculares fueron siempre mayores a los esperados). Por otro lado, no se encontró ninguna secuencia de más de dos aminoácidos en la unidad que sea compartida con los primeros 20 aminoácidos del SAPA descartando en principio un sitio sensible a una proteasa específica. Esto sugirió que la hidrofobicidad "acompañaría" a la degradación.

3) La proteína A trunca en estos vectores, posee una región hidrofóbica el péptido señal el cual se cliva por una proteasa ubicada a nivel del periplasma el resto es totalmente hidrofílico y su transporte hacia el exterior es, por supuesto, muy eficiente ya que por otro lado, se trata de un proceso fisiológico.

4) La fusión SPA-SAPA completa (SAPA₊) presenta tres bandas, si se deleta la zona C-terminal (altamente hidrofóbica), clon pFEH, desaparece la banda de mayor peso molecular (ver

FIGURA 19

Perfil de hidropatía del antígeno 2 correspondiente a la unidad del motivo de secuencia repetida, ubicada en el extremo N-terminal **A**, y de la parte C-terminal **B**, la que no corresponde a la repetición. **C**: Análisis por SDS-PAGE 12%, de la fusión SPA-Ag2 (vector pRIT11) expresada en *S. aureus* RN4220, rescatada y purificada según la rutina. 1: 5 ug de proteína sembrada. 2: 5 ug de SPA. 3: 12 ug de proteína sembrada. El peso molecular esperado es señalado con la flecha.

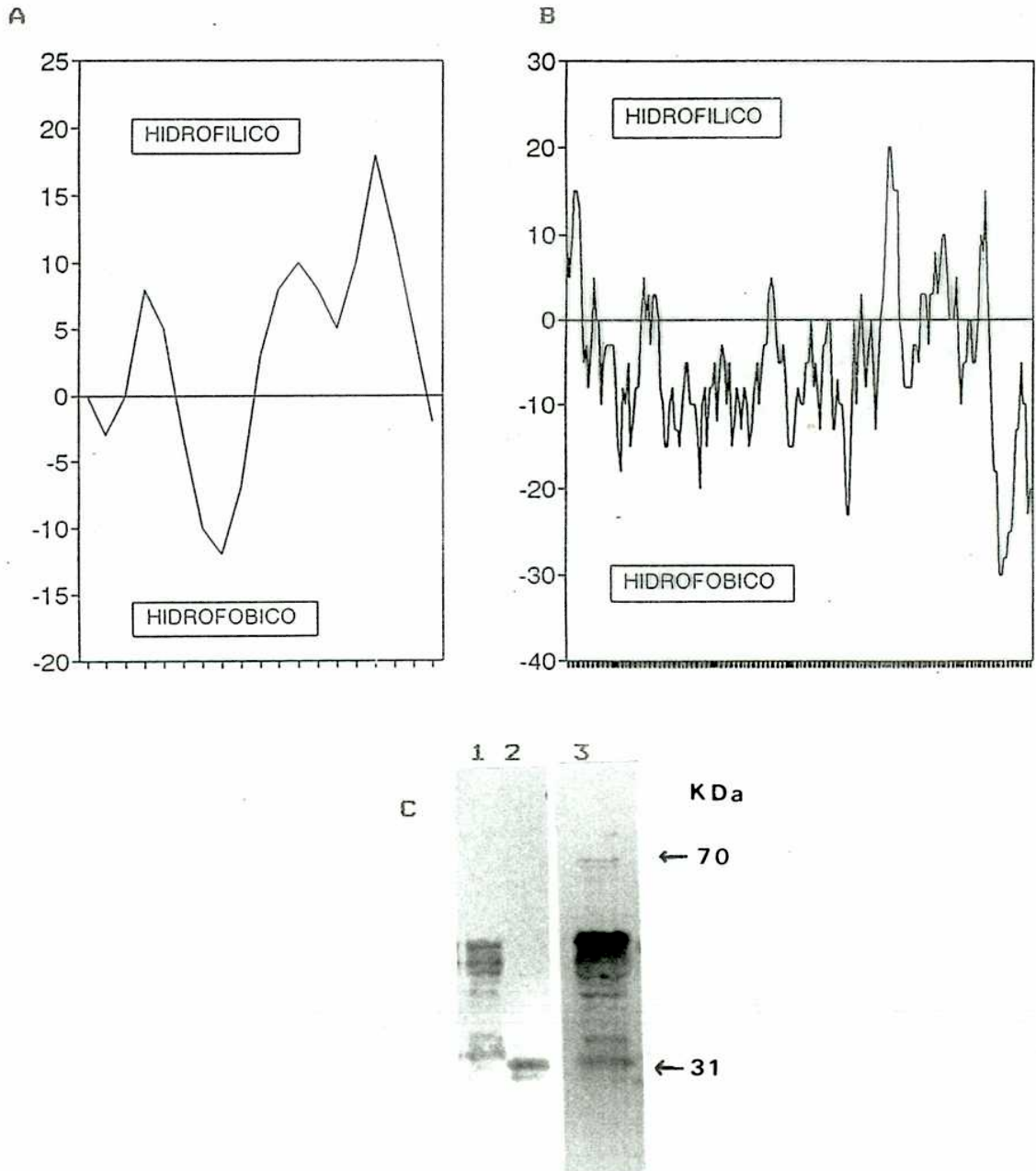


figura 16C, pag 128); si aún se elimina la parte N-terminal (con una región hidrofóbica), clon pFSH, la fusión no se degrada y es estable aún en tiempos tan largos como 16 hs (para mayor aclaración ver figura 20).

Por otro lado quedó demostrado que la degradación se dio durante la expresión. La ruptura podría ocasionarse durante el transporte hacia el medio extracelular.

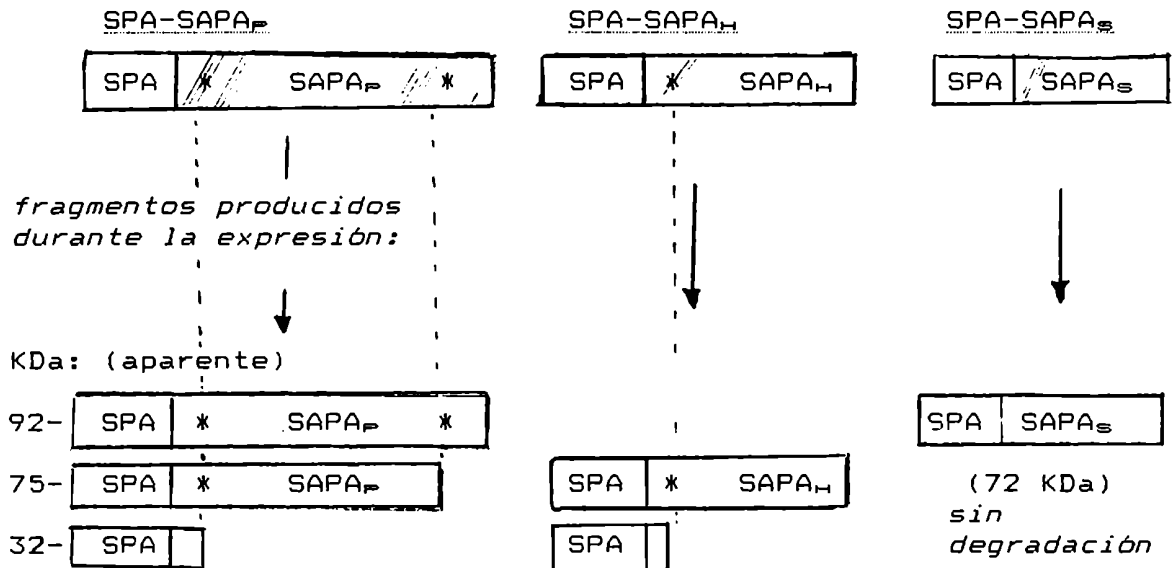
Sobre la base de todos estos resultados y observaciones, se podría postular que el pasaje de la fusión a través de la membrana, el cual comienza por la SPA, se encontraría retardado cuando las regiones hidrofóbicas entran en contacto con esta. Este retraso aumentaría la probabilidad de un encuentro con las proteasas asociadas a membrana o al periplasma, clivando a la fusión en esa zona, de forma parecida a lo que ocurre con el péptido señal propio de la SPA (ver introducción). Una fracción escaparía a esta acción proteolítica dejando la fusión intacta (ver figura 14B pag 119 y figura 16C, pag 128).

Resultados reportados por Nilsson (Nilsson y col 1985b) en la expresión de IGF1 fusionada a SPA, mostraron un efecto similar al observado en la SPA-SAPA_H, donde la fusión sufrió un clivado cercano a la zona de unión SPA-IGF1. Es interesante mencionar que la región N-terminal del IGF1 auténtico es también hidrofóbica (y en mayor magnitud respecto del SAPA) la cual comprende desde el primer residuo (a partir del N-terminal de la proteína auténtica) hasta el N° 20. Este dato fue obtenido a partir de la secuencia amino-

FIGURA 20

Esquema de la fusiones SPA-SAPA_P, SPA-SAPA_H y SPA-SAPA_S expresadas por los plásmidos pRIT11-f7, pFEH y pFSH detallando las zonas de ruptura (*) y sus respectivos fragmentos, deducidas a partir de los experimentos de las figuras 15C, 16B, 16D y 18. Las areas sombreadas indican zonas hidrofóbicas. A continuación se muestra la secuencia nucleotídica y aminoacídica (de Affranchino y col, 1989) del fragmento *EcoRI*-*Sau3AI* ubicado en el extremo 5' del SAPA, (ver también figura 14A), el cual fue deletado para dar el clon pFSH (SPA-SAPA_S).

Fusión:



EcoRI

GAA TTC GGG CCA ACC ATA AGC CAC GTG ACG GTG AAT AAT GTT CTT
 Glu Phe Gly Pro Thr Ile Ser His Val Thr Val Asn Asn Val Leu

Sau3AI

CTT TAC AAC CGT CAG CTG AAT GCC GAG GAG ATC
 Leu Tyr Asn Arg Gln Leu Asn Ala Glu Glu Ile

ácida (Rinderknecht & Humbel, 1977) analizada con el programa Pustell V4 (ver sección 5.1, pag 41).

La zona correspondiente a los primeros 10-15 aminoácidos no es inmunógena (o si lo es, sería muy débil) puesto que el antisuero de conejo no reacciona contra esta (ver figura 14B, pag 119) y además la región C-terminal, que también se deletó, es altamente hidrofóbica y por lo tanto poco probable de ser inmunógena. Por otra parte la región constituida únicamente por la repetición probó ser inmunodominante respecto a otras dentro de la proteína nativa (Buschiazzo y col 1991) y por ser hidrofílica (figura 3C, pag 69). Por lo tanto la producción del péptido correspondiente a esta región, sería suficiente como reactivo de diagnóstico.

6.9 - FUSION DE ANTIGENOS DISTINTOS

La formación de quimeras entre antígenos, fue iniciada en las experiencias anteriores con el Ag 1 y el SAPA obteniéndose una proteína parcialmente degradada puesto que el SAPA original tenía zonas de ruptura. Por consiguiente, se partió de la siguiente premisa: "si los antígenos fusionados individualmente a SPA no se degradan, las quimeras hechas entre estos, tampoco lo harán".

6.9.1 - FUSION DEL Ag1 CON EL Ag30

El fragmento de ADN del Ag 30 y del Ag 1 (f_{30} y f_1) conservan el mismo marco de lectura desde un extremo *EcoRI* hasta el otro. Tomando ventaja de esto, se decidió fusionar

ambos en el vector pRIT21, porque la cantidad de sitios de restricción que posee en el MCS es mayor que en el pRIT11.

La estrategia se esquematiza en la figura 21A, los clones positivos para ambos antígenos fueron rechequeados por Dot blot (figura 21B, pag 142) y los plásmidos recombinantes se estudiaron por restricción (figura 21C, pag 143) demostrándose que se han obtenido las dos alternativas, esto es: SPA-Ag1-Ag30 (130) y SPA-Ag30-Ag1 (301).

Los ensayos de Dot-blot confirmaron en ambas fusiones, que ambos antígenos reaccionaron con sus respectivos anticuerpos, sin presentar aparentemente, ningún tipo de interferencia.

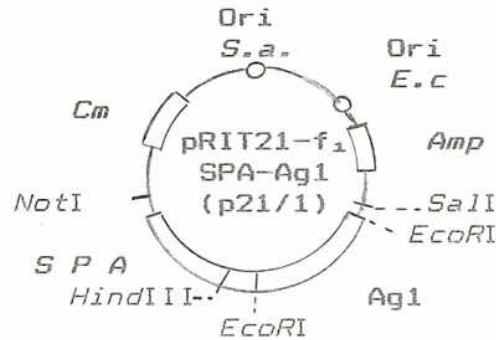
La expresión en *S.aureus* mostró que ambas quimeras son estables (figura 21D pag 144) con un peso molecular aparente de 120 KDa, mientras que el esperado fue de 103 KDa (31 KDa + 52 KDa + 20 KDa; para la SPA, Ag1 y Ag 30 respectivamente). La 130, resultó ser menos sensible a la degradación. Es posible que en este sistema la composición aminoacídica del extremo C-terminal contribuya en la estabilidad, ya que cuando la parte 30 está en ese extremo, la triple fusión se vio más protegida.

Esta doble fusión fue expresada en *S.aureus* a un nivel de 10 mg/l de cultivo y por lo tanto podría ser llevada a preparaciones en gran escala sin mayores inconvenientes.

Sería de esperar que cada suero de paciente positivo ya sea para uno de estos dos antígenos o para ambos, reaccione de igual forma con esta quimera (no todos los sueros anti-1

FIGURA 21 A

Estrategia usada para fusionar en Ag1 con el Ag30.



1) Digestión parcial *EcoRI*, separación de los productos por electroforesis en gel de agarosa 0,4%: 1, pRIT21 digerido con *EcoRI*. 2, pRIT21-f₁ "linearizado" con *SaII*. 3, restricción parcial *EcoRI*. La flecha señala la forma lineal (*EcoRI*) del plásmido pRIT21-f₁.

1 2 3



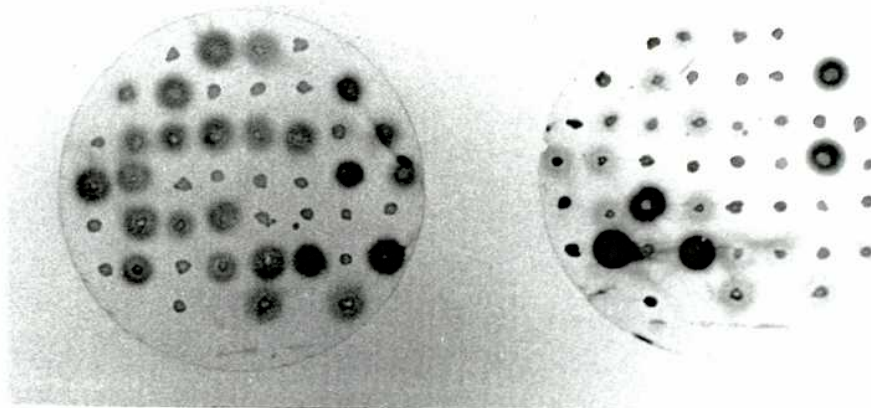
2) Electroelución de la formas lineales del pRIT21-f₁/*EcoRI*.



3) Ligación de estas formas con el fragmento del Ag30, purificado por electroelución, transformación en *E.coli* HB101, réplica de placa de las colonias a partir de la placa madre y rastreo inmunológico de éstas con As anti-1 y con As anti-30 por separado de las cuales se muestra un sólo juego con 5 clones positivos para el 30 y para el 1 simultáneamente.

As anti-1

As anti-30



F I G U R A 21 B

Confirmación por Dot blot de los 7 clones positivos. Se detalla la posición de cada clon y la cantidad de proteína sembrada en ng. A: extracto de *E.coli* transformada con pRIT21. B: extracto de *E.coli* transformada con pRIT21-f₁. C: extracto de *E.coli* transformada con pRIT21-f₃₀. 1 al 7 extractos de los 7 clones positivos.

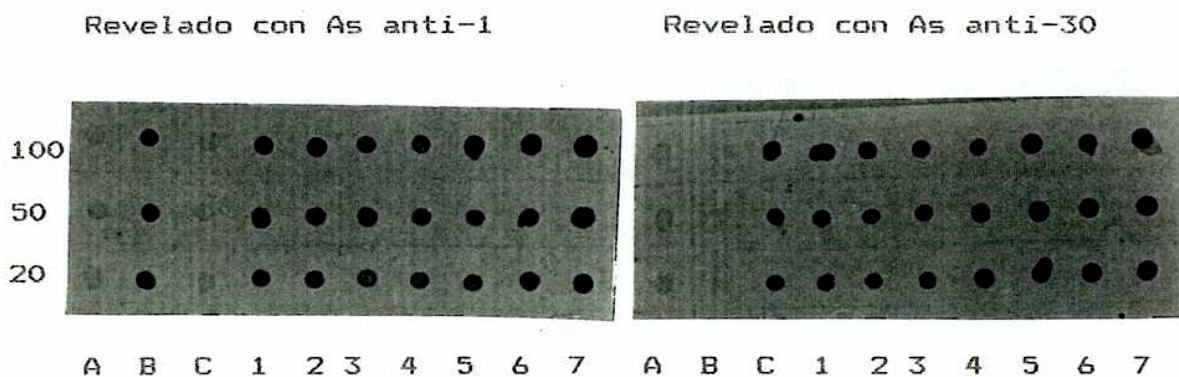
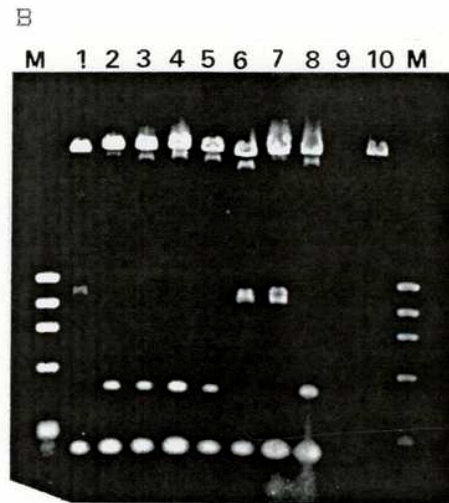
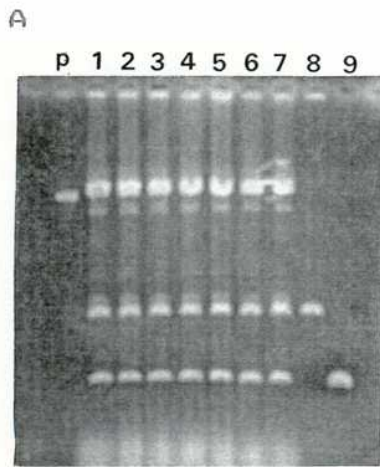


FIGURA 21 C

Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1,2% de los plásmidos pertenecientes a los 7 clones positivos:

A: p, pRIT21. 1 al 7, plásmidos de los 7 clones positivos de la figura anterior, todos digeridos con *EcoRI*. 8, f_1 . 9, f_{30} .

B: M, ADN de fago FiX174 digerido con *HaeIII*. 1 al 7, plásmidos de los 7 clones positivos de la figura anterior digeridos con *HindIII*. 8, pRIT21- f_1 digerido con *HindIII*. 9, pRIT21- f_{30} digerido con *HindIII*. 10, pRIT21 digerido con *EcoRI*. Clones 1; 6 y 7 son iguales y corresponden al orden: SPA-Ag30-Ag1 (301). Clones 2; 3; 4 y 5 corresponden al orden: SPA-Ag1-Ag30 (130) (ver el esquema inferior).



H: Sitio *HindIII*. E: *EcoRI*

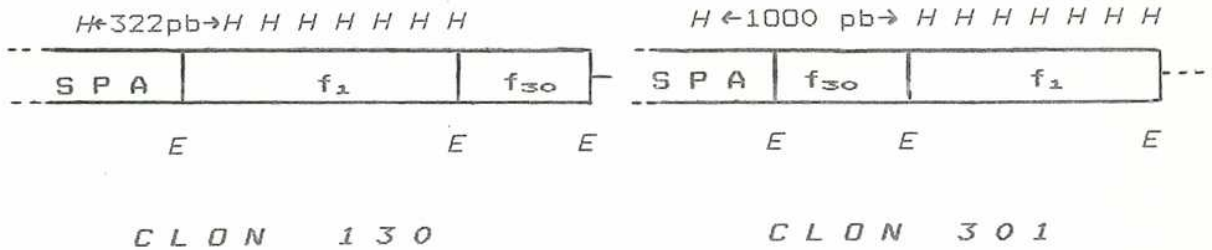
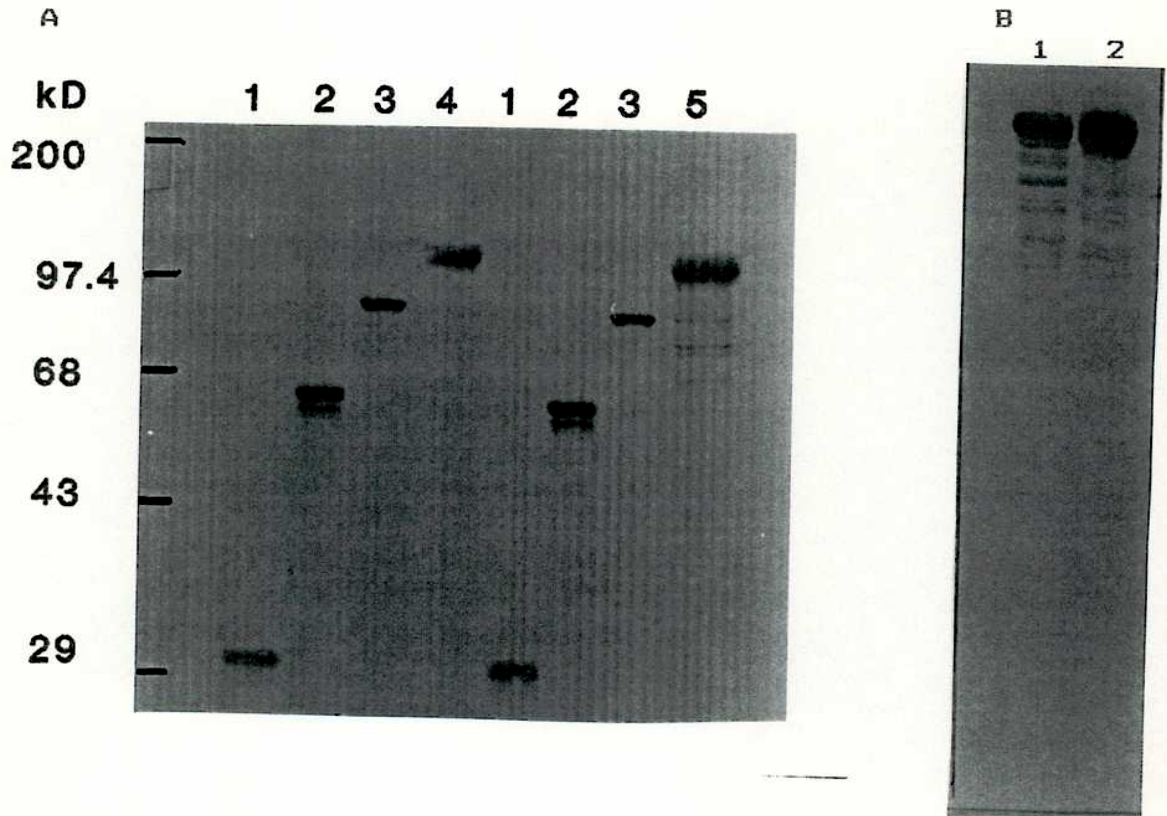


FIGURA 21 D

Análisis por SDS-PAGE 10% de las fusiones 130 y 301 expresadas en *S.aureus*. A: 1, SPA. 2, SPA-Ag30. 3, SPA-Ag1. 4, SPA-130. 5, SPA-301. Todas las calles fueron sembradas con 5 ug de proteína. B: Estabilidad de las quimeras. 1, 10 ug de SPA-301. 2, 15 ug de SPA-130.



positivos lo son para el 30 y viceversa, Ibañez y col 1988). De esta forma se simplificaría el trabajo, en la producción de un reactivo de diagnóstico específico de la fase crónica, ya que los anticuerpos anti-1 y anti-30 son los más representativos en este período de la enfermedad (Ibañez y col 1988).

6.9.2 - FUSION DEL Ag1 y Ag30 CON EL SAPA

Una vez lograda la doble fusión p130 y p301, se eligió el SAPA (f_{SH}) para fusionarlo en el extremo 3' de ambas quimeras, ya que el péptido correspondiente es estable en la fusión con SPA. La estrategia de fusión se esquematiza en la figura 22A (páginas 146 y 147). Se confirmó la reactividad de varios clones, positivos para el SAPA, de cada grupo (esto es a partir del 130 y del 301), frente a los antisueros anti-1, anti-30 y también anti-SAPA demostrando que la reacción antígeno-anticuerpo, para un determinado antígeno dentro de la misma molécula, no es impedida por los restantes (figura 22B, pag 148).

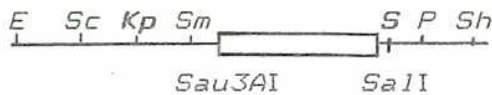
Un posterior análisis por Western blot mostró que sólo uno fue medianamente estable (figura 22C, pag 149) correspondiente al N° 10 el cual pertenece al grupo 130- f_{SH} y fue llamado 130-S.

La expresión de esta quimera fusionada a SPA, en *S.aureus*, resultó en aproximadamente 6 mg/l de cultivo. Esta disminución en el nivel de expresión, pudo ser debida a que la triple fusión Ag1-Ag30-SAPA sea demasiado grande para este sistema.

FIGURA 22 A

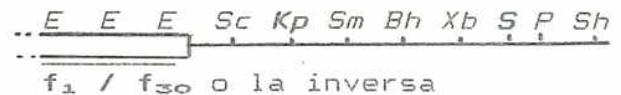
Estrategia empleada para fusionar el SAPA_S a las quimeras 301 y 130.

Esquema del f_{SH} en el MCS del pRIT22.



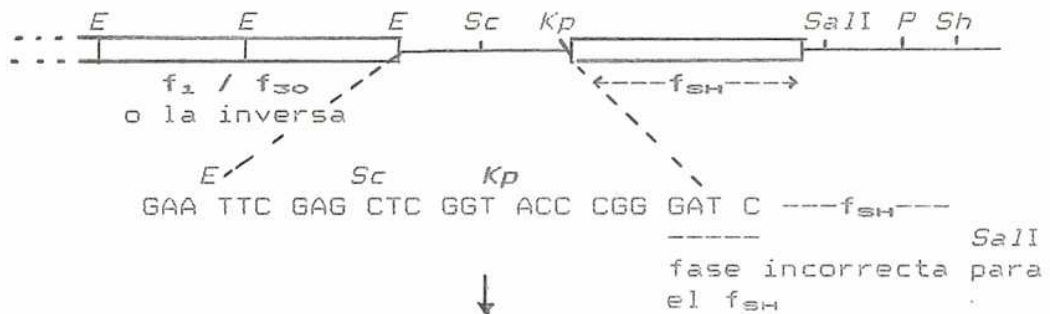
1) Digestión con *KpnI/Sall*, separación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa 1% y electroelución del f_{SH} .

Esquema de las quimeras 301 y 130 en el MCS del pRIT21.

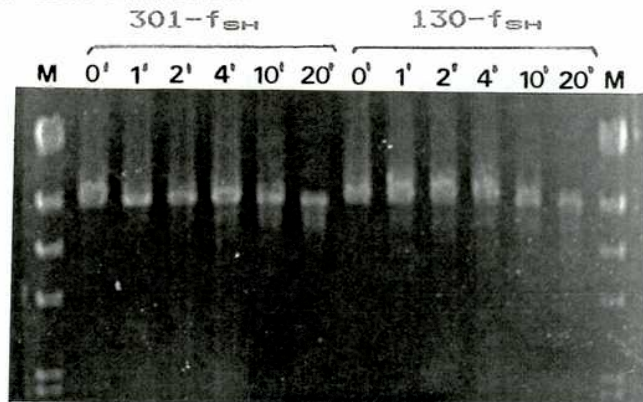


1) Digestión con *KpnI/Sall*.

2) Ligación, transformación en *E. coli* HB101 y análisis de los clones ya sea para el 301 o el 130 confirmando la presencia del inserto f_{SH} dando los clones 301- f_{SH} y 130- f_{SH} :



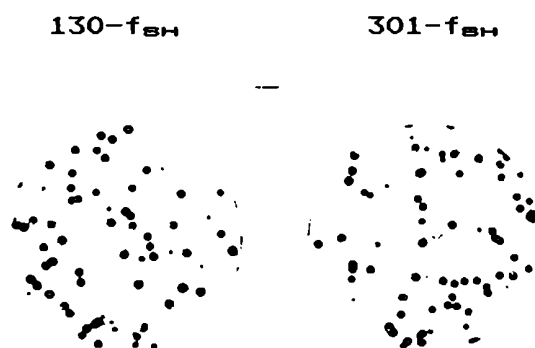
3) Digestión con *KpnI* y tratamiento con Exonucleasa BAL-31 a distintos tiempos (minutos). M: ADN de fago lambda digerido con *HindIII*;



E: *EcoRI*; Sc: *SacI*; Kp: *KpnI*; Sm: *SmaI*; Bh: *BamHI*; Xb: *XbaI*; S: *Sall*; P: *PstI*; Sh: *SphI*.

continuación de la figura 22 A

- 4) "Rellenado" de los extremos con enzima de Klenow en presencia de los cuatro NTPs del ADN de las muestras tratadas con BAL-31 durante 1'.
- 5) Ligación, "recircularizando" los plásmidos, transformación en *E.coli* HB101 e identificación de los clones por rastreo inmunológico usando As específico de conejo anti-SAPA

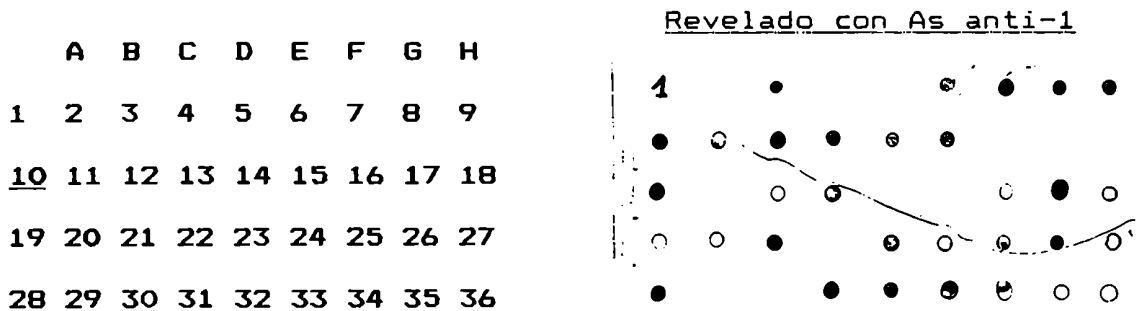


F I G U R A 22 B

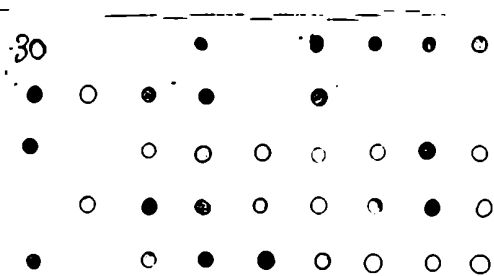
Análisis por Dot blot de 16 clones positivos del grupo 130- f_{SH} (del 1 al 16) y 20 clones positivos del grupo 301- f_{SH} (del 17 al 36).

Cada casillero fue sembrado con 50 ng de proteína a partir de extractos de *E. coli* transformada.

A: pRIT21. B, pRIT21- f_1 (SPA-Ag1). C, pRIT21- f_{30} (SPA-Ag30). D, pRIT21- f_{SH} (SPA-SAPA₃). E, 130. F, 301. G, 130- f_{SH} . H, 301- f_{SH} .



Revelado con As anti-30



Revelado con As anti-SAPA

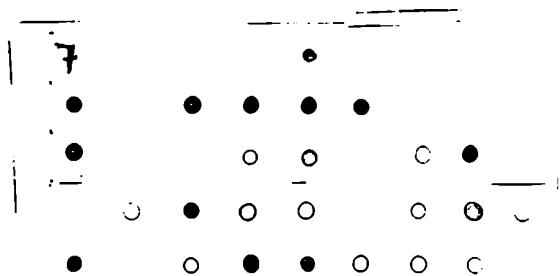


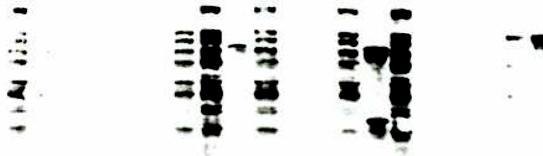
FIGURA 22 C

Análisis por Western blot de los extractos analizados por Dot blot en la figura 22B, revelado con IgG-H. Cada calle fue sembrada con 2 ug de proteína total. Las dos últimas calles corresponden a extractos de los clones 301 y 130.

130-f_{SH} con el SAPA puesto en fase

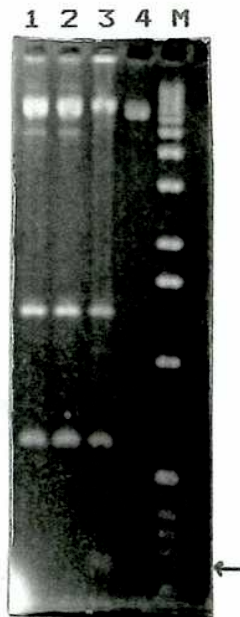


301-F_{SH} con el SAPA puesto en fase



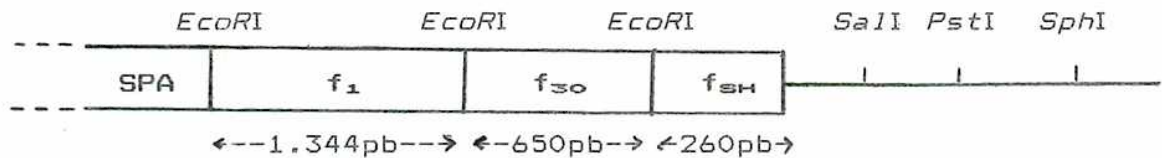
El plásmido recombinante, fue analizado por restricción, determinando que la exonucleasa BAL31 solamente dejó unos 260 pb del f_{5H} inicial (600 pb) sin afectar el f₃₀ ya que el sitio EcoRI no fue eliminado (figura 22D) Por lo tanto han quedado 7 de las 15 repeticiones originales del SAPA. En teoría este número de repeticiones debería ser suficiente para detectar los mismos sueros positivos para el SAPA original ya que se trata de la misma zona inmunodominante (Buschiazzo y col, 1991).

Por lo tanto el peso molecular calculado para esta quimera fusionada a SPA fue de 113 KDa (31 KDa + 52 KDa + 20 KDa + 10 KDa; para la SPA, Ag1, Ag30, SAPA respectivamente), mientras que el peso molecular aparente fue de 135 KDa (ver figura 22E, pag 152).

FIGURA 22 D

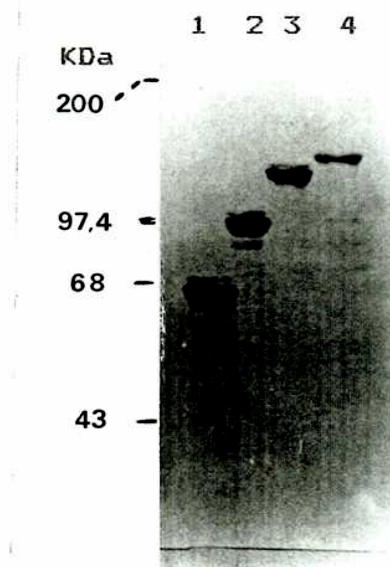
Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1,5% del plásmido correspondiente al clon 10, ahora llamado 130-S (señalado en la figura anterior) por restricción: 1, 130 digerido con *EcoRI*. 2, 130-S digerido con *EcoRI*. 3, 130-S digerido con *EcoRI/SalI* (nótese la aparición de la banda de 260 pb, señalada con la flecha). 4, pRIT21 digerido con *EcoRI*. M, marcador de peso molecular 1 Kb ladder (BRL. USA).

Esquema detallando el estado de la quimera 130-S (clon 10) en el pRIT21, el cual conserva sus sitios *EcoRI*. (ver figura 22A, paso 2)



F I G U R A 22 E

Análisis por SDS-PAGE 8% de las proteínas quiméricas fusionadas a SPA, expresadas en *S.aureus*, en el vector pRIT21, y purificadas según la rutina. 1, 10 ug de fusión SPA-Ag30. 2, 10 ug de fusión SPA-Ag1. 3, 6 ug de fusión SPA-Ag1-Ag30 (130). 4, 3 ug de fusión SPA-Ag1-Ag30-SAPA (130-S).



7 - C O N C L U S I O N E S

Se ha estudiado un sistema de expresión de cuatro antígenos de *Trypanosoma cruzi* y su rápida purificación, el cual involucró la formación de proteínas de fusión de cada uno de estos con la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA). De este trabajo se han podido obtener las siguientes conclusiones.

A) La producción de la fusión en *S.aureus*, probó ser mucho mas ventajosa respecto a *E.coli* por la rapidez y simplicidad en el procedimiento de extracción y purificación por cromatografía de afinidad, al eliminarse la etapa de ruptura celular.

Además, la degradación resultó menor que en *E.coli* y por lo tanto, no se ha requerido ningún tipo de inhibidor de proteasas en todo el procedimiento.

B) Tanto el Ag 1 como el Ag 30 , fusionados a SPA, se han expresado en niveles que pueden llevarse a escala industrial (14 mg/l de cultivo y 9 mg/l de cultivo) en *S.aureus*.

C) La proteólisis específica con enteropeptidasa separó la fusión en sus dos mitades (salvo el Ag13) las que fueron perfectamente separables por un segundo pasaje por cromatografía de afinidad (IgG-Sepharosa) dando un rendimiento final de 7 mg/l de cultivo, para el Ag1 y de 2,16 mg/l de cultivo para el Ag30. La recuperación final no coincidió con la esperada siendo de 80% y 77% respectivamente.

D) El antígeno 13 y el SAPA presentaron dos problemas distintos:

Si bien la estabilidad del antígeno 13 fusionado a SPA fue muy buena, esta presentó dos dificultades. La primera fue la baja productividad en la correspondiente proteína fusión (6,5 mg/l de cultivo) en *S.aureus*. La segunda fue la proteólisis poco eficiente, cuando se empleó el factor de coagulación Xa, y la imposibilidad de usar preparaciones de enteropeptidasa contaminadas con otras enzimas proteolíticas.

La proteína SAPA fusionada a SPA presentó el caso contrario al anterior. Si bien la degradación observada durante la expresión con la proteína intacta fue muy alta, el posterior tratamiento con enteropeptidasa no pareció afectarla aún más.

Un posterior estudio demostró que eliminando zonas hidrofóbicas presentes en esta molécula, la fusión fue altamente estable aún en tiempos de cultivos tan largos como 16 hs. Los niveles de expresión de esta última fusión fue equivalente al caso del antígeno 30.

F) De esta última observación y de otras, puede decirse que toda proteína que presente zonas hidrofóbicas, posiblemente tenga alguna dificultad con la degradación cuando este sistema de expresión es empleado. En el caso particular de expresar proteínas antigénicas, para el diagnóstico o la obtención de anticuerpos, el problema se reduciría a realizar construcciones genéticas en la que dichas zonas podrían

obviarse, ya que en principio los determinantes antigénicos se encontrarán con mayor probabilidad en regiones hidrofílicas. La proteína SAPA mostró un ejemplo de que no es necesario expresar la molécula entera.

G) Si bien la fusión entre antígenos distintos fue hecha en forma incompleta, los ensayos realizados mostraron que es posible obtener en una sola proteína quimérica todos los antígenos que fueron clonados en forma independiente, de forma tal de producir y purificar todo el repertorio antigénico en un solo procedimiento.

Los ensayos por Dot blot, demostraron que la reacción Ag-Ac para un antígeno en la molécula 130-S, no es interferida (aparentemente) por los restantes. Por lo tanto, esta quimera podría ser sometida a una prueba de campo.

8 - P E R S P E C T I V A S

Si bien se han establecido las bases de una forma de producción a escala industrial de estas proteínas para el diagnóstico y el desarrollo de una vacuna, queda por estudiar la optimización en las condiciones de producción en grandes volúmenes en un fermentador (como ser 50 l).

Queda por establecer si es posible un clivado químico, sobre todo para la fusión SPA-Ag13, y de serlo, verificar si es mas efectivo que el enzimático en términos de rendimiento final y costos.

Faltaría demostrar si la proteína 130-S puede reaccionar con sueros de pacientes tan bien como lo hace cada uno de los antígenos por separado. Se requerirá de un ensayo con un número significativo de sueros de pacientes chagásicos, previamente chequeados con las proteínas individuales para hacer válido el diagnóstico con esta quimera.

Queda abierta la posibilidad de obtener proteínas quiméricas con mayor cantidad de antígenos que la 130-S, si el comportamiento de esta, frente a sueros de pacientes, es el esperado. De esta forma se aumentaría aún mas la probabilidad de reacción.

Respecto a la fusión 130-S, el problema se presentó en los niveles de expresión, quizá por el tamaño de esta. Si todos los antígenos de esta colección, están constituidos por motivos de secuencia repetida, podría construirse una quimera

que conste de unas pocas unidades de cada uno. Así, esta nueva proteína tendría un peso molecular no tan elevado y representaría todo el repertorio de antígenos disponibles. Por ejemplo, una fusión consistente en dos unidades de cada uno de ellos tendría aproximadamente un peso molecular de 24,5 KDa (15. KDa + 1,1 KDa + 3,1 KDa + 5,3 KDa, para los Ags 1; 13; 30 y SAPA respectivamente). Este tamaño, hipotéticamente hablando, no presentaría los problemas en los niveles de expresión, observados en la 130-S puesto que cada fusión por separado no los tuvo. Además la estandarización del clivado específico (ya sea enzimático o químico) se haría sobre una sola fusión lo que simplificaría aún más toda la línea de producción.

La proteína 130-S fusionada a SPA, podría aportar a estudios de protección ya que los tres antígenos (1; 30 y SAPA) son exhibidos por el parásito en la etapa temprana de la infección (Leguizamón y col 1990). Además la SPA actúa como adjuvante (Löwenadler y col, 1986 y 1987; Valerie y col, 1987) y por lo tanto no solo su eliminación no sería requerida sino que su presencia podría ser importante.

Sería interesante estudiar otras formas de expresión tales como las fusiones a glutation-S-transferasa que proporciona la serie de vectores pGEX (ver sección 3.2.1). Si bien este sistema es expresable sólo en *E.coli*, presenta la ventaja de que la GST no se une a los componentes del suero humano. Por lo tanto la eliminación de ésta por proteólisis no sería importante si estos antígenos, ya sean individuales

9 - A B R E V I A T U R A S

| | |
|------------------------|--|
| Ac | : Anticuerpo. |
| Ag | : Antígeno. |
| AH | : Apéndice de afinidad (por ejemplo SPA). |
| As | : Antisuero. |
| b | : Bases. |
| beta-gal | : Beta-galactosidasa. |
| <i>cI_{ts}</i> | : Represor cI termosensible. |
| <i>E.coli</i> | : <i>Escherichia coli</i> . |
| Ep | : Enteropeptidasa (Enteroquinasa). |
| Fc | : Fracción cristalizante de las inmunoglobulinas. |
| f _x | : Fragmento de ADN que codifica para el antígeno X. |
| GST | : Glutación-S-transferasa de <i>Schistosoma japonicum</i> |
| IgG | : Inmunoglobulina G. |
| IgG-H | : Inmunoglobulina G humana. |
| IPTG | : Isopropiltio-beta-galactósido (inductor del operón <i>lac</i>). |
| Kb | : Kilobases. |
| <i>lac</i> | : Operón lactosa. |
| MCS | : Sitio múltiple de clonado. |
| NET | : Búffer Tris-ClH/Cloruro de sodio. |
| pb | : Pares de bases. |
| PBS | : Búffer fosfato salino. |
| PMSF | : Fenilmetilsulfonilfluoruro. |
| P _R | : Promotor derecho del fago lambda. |
| <i>S.aureus</i> | : <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| SAPA | : "Shed Acute Phase Antigen". |

- SAPA₁ : Proteína SAPA codificada por el fragmento de ADN original.
- SAPA₂ : Proteína SAPA codificada por el fragmento de ADN desde el sitio 5' *EcoRI* hasta el 3' *HaeII*.
- SAPA₃ : Proteína SAPA codificada por el fragmento de ADN desde el sitio 5' *Sau3AI* hasta el 3' *HaeII*.
- SDS-PAGE : Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante / SDS.
- SMM : Búffer Sacarosa/Cloruro de Magnesio/ácido Maleico.
- SMMP : SMM/Caldo "Pennassay" Difco 2X.
- SPA : Proteína A de *Staphylococcus aureus*.
- SPA-Ag_x : Fusión de la proteína A con el antígeno X.
- T.cruzi* : *Trypanosoma cruzi*.
- TBS : Búffer Tris-ClH/Cloruro de sodio.
- TE : Búffer Tris-ClH/EDTA.
- TP : Proteína de interés que es fusionada a la AH.
- TTBS : Búffer Tris-ClH/Cloruro de sodio/Tween 20
- X-gal : 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido (cromógeno para beta-galactosidasa).

10 - R E F E R E N C I A S

- ABRAHMSSEN,L; MOKS,T; NILSSON,B AND UHLEN,M. (1986) Nucl Acids Res 14, 7487.
- ABRAHMSSEN,L; MOKS,T; NILSSON,B; HELLMAN,U AND UHLEN,M. (1985). EMBO J 4, 3901-3906.
- ABRAHMSSEN,L; MOKS,T; NILSSON,B; HELLMAR,U; AND UHLEN,M. (1985). EMBO J 4 3901.
- AFFRANCHINO,J.L., IBANEZ,C.F., LUQUETTI, A.O., RASSI,A., REYES, M.B., MACINA,R.A., ASLUND, L., PETTERSON, U. AND FRASCH, A.C.C. (1989). Mol.Biochem.Parasitol.,34:221-228.
- ALI OUAISSI, M.,CORNETTE,J. AND CAPRON, A.(1986) Mol. Biochem. Parasitol. 19, 201-211.
- ANDERSSON,E. AND BAILEY,JE. (1989). J Biotechnol 11, 37
- ANDREWS,NW; KATZIN,AM AND COLLI,W. (1984). Eur J Biochem, 140, 599.
- ARAUJO,FG AND REMINGTON,JS. (1981).J Immunol 127, 855.
- BASOMBRIO,MA AND ARREDES,H. (1987). J parasitol, 73, 236.
- BEISIEGEL, U.M. (1986) . Electrophoresis 7, 1-18.
- BIANCO AE, FAVALORO JM, BURKOT TR, CULVENOR JG, CREWTER PE, BROWN GV, ANDERS RF, COPPEL RL AND KEMP DJ. (1986). Proc Natl Acad Sci USA 83, 8713.
- BIRNBOIM HC, AND DOLY J (1979). Nucl Acids Res 7: 1513-1523,
- BLONDEL,A AND BEDOUELLE,H. (1990). Eur J Biochem 193, 325-330.
- BRADFORD,MM. (1976). Anal Biochem 72, 248.
- BRENER,Z (1986).Afr J Clin Exp Immunol 3,327-345.
- BREWER, SJ. AND SASSENFELD, HM (1985) Trends Biotechnol. 3, 119-122.
- BURGESS, DE AND HANSON,WL. (1979). Infect Immun 25, 838.
- BUSCHIAZZO,A; POLLEVICK,GD; MAUTER,M; FRASCH,ACC Y SANCHEZ DO. (1991). XXVII Reunión Anual de la SAIB, M 02, 68.

- CAZZULO JJ ET AL (1990) *Biochim Biophys Acta* 1037, 186.
- CHANG, S. AND COHEN,S.N. (1979). *Mol.Gen.Genet.*168:111-115.
- CHANG,S; AND COHEN,SN. (1979). *Mol Gen Genet* 168, 111.
- CHEN,L; FORD,C AND NIKOLOV,Z. (1991). *Gene* 99, 121-126.
- CONTRERAS,VT; MOREL,CM AND GOLDENBERG,S. (1985). *Mol Biochem Parasitol*, 14, 83.
- CRONAN,JE JR (1991). *J Biol Chem* 265, 10,327-10,333.
- DE BOER, HA; COMSTOCK,LJ; AND VASSER, M.(1983). *Proc Natl Acad Sci USA* 80 21-25.
- DEISENHOFER,J; JONES,TA, HUBER,R; SJODAHL,J AND SJOQUIST,J. (1978). *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chem* 359.
- DENTE,L; CESARINI,G AND CORTESE,R. (1983). *Nucleic Acids Res* 11, 1645.
- DEUCHELE,U; KAMNERER,W; GENTZ,R AND BUJARD,H. (1986). *EMBO J* 5, 2987.
- DRAGON,EA; BROTHERS,VM; WRIGHTSMAN,RA AND MANNING,J. (1985). *Mol Biochem Parasitol* 16, 213.
- DRAGON,EA; SIAS,SR; KATO,EA AND GABE,JD (1987). *Mol Cell Biol*, 7, 1271.
- DYKES,CW; BOOKLESS,AB; COOMBER,BA; NOBLE,SA; HUMBER,DC AND HODBEN AN. (1988). *Eur J Biochem* 174, 411-416.
- EDOUELLE,H AND DUPLAY,P. (1988).*Eur J Biochem* 171 541-549.
- ENGMAN,JM. (1989). *Mol Biochem Parasitol.* 37, 285.
- FORD, CF; SUOMINEN,I AND GLATZ CE. (1991). *Protein Expression and Purification* 2, 95-107.
- FORSGREN,A. (1970). *Infec Immun.*vol 2, 5, 672.
- FRASCH A.C.C.,SANCHEZ D.O. AND CAZZULO,J.J. (1990) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 85 (4):* 523-529, oct-dec.
- FRASCH,ACC AND REYES,MB. (1990) *Parasitology Today*, 6, 137.
- FRASCH,ACC; CAZZULO, JJ; ASLUND,L AND PETERSON, U. (1991). *Parasitology Today* vol 7, 6, 148.
- GERMINO,J AND BASTIA,D. (1984). *Proc Natl Acad Sci USA* 81. 4692-4696.

GEYSEN,MH; TAINER,JA; RODDA, SJ; MASON,TJ; ALEXANDER,H;
GETZOFF,ED AND LERNER,RA. (1987). Science, 235, 1184.

GOEDEL,DV; KLEID,DG; BOLIVAR,F; HEYNEKER,HL YANSURA DG, CREA,
R; HIROSE,T; KRASZEWSKI,A; ITAKURA,K AND RIGGS,AD. (1979).Proc
Natl Acad Sci USA 76, 106-110.

GONZALEZ NS; SANCHEZ DO; FRASCH ACC AND ALGRANATI, ID. (1984).
Mol Cell Biochem, 63, 157.

GRAY,MR; COLOT,HV; GUARENTE,L AND ROSBASH,M. (1982) Proc Natl
Acad Sci USA 79 6598-6602.

GREENWOOD,JM; GILKES,NR; KILBURN, DG; MILLER,RC AND WARREN,
RAJ (1989).

GUAN,C; LI,P; RIGGS,PD AND INOUE,H (1988). Gene 67, 21-30.

HANADA,K; YAMATO,I AND ANRAKU,Y. (1988) J Biol Chem 263,
7184-7185.

HANAHAM D (1983). J Mol Biol 166, 557-580, 1983

HARDY, K. Aspects of Microbiology 4. Bacterial Plasmid 2nd
edition. ASM Series Editor. Geneva Switzerland. 1986.

HARRIS,TJ (1983). "Genetic Engineering", vol 4 127-185.

HELFMAN,DM; FERAMISCO,JR; FIDDES,JC; THOMAS,GP AND HUGHES SH.
(1983) Focus, vol 6, No 1.

HESFORD,F; HADORN,B; BLASER,K AND SCHNEIDER,CH. (1976). FEBS
Lett 71, 279.

HIREL,P; LEVEQUE,F; MELLOTT,P; DARDEL,F; PANVERT,M; MECHULAN,Y
AND FAYAT,G. (1988). Biochimie 70, 773-782.

HOCHULI,E; BANNWARTH,W; DOBELI, H; GENTZ,R AND STUBER,D.
(1988). Bio/Technol 6, 1321-1325.

HOFT, DF. (1989). Infect Immuno 57, 1959.

HOPP, TP; PRIKETT, KS; KPRICE, VL; LIBBY, RT, MARCH, CJ,
CERRETTI, DP; URDAL, DL AND CONLON, PJ. (1988). Bio/technol.
6, 1204-1210.

HOPP,TP; WOODS,KR. (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78; 6, 3824.

HORINOUCHI,S AND WEISBLUM,B. (1982) J Bacteriol vol 150, 2,
815.

HUDSON,L. (1985). Parasitol Today, 1, 6.

- HUMMEL, M; HERBST, H AND STEIN, H. (1989). *Eur J biochem* 180, 555-561.
- HUTCHENS, TW AND YIP TT (1991). *Anal Biochem* 191, 160-168.
- IBANEZ, C.F., AFFRANCHINO, J.L. AND FRASCH A.C.C. (1987) *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 175-184.
- IBANEZ, C.F., AFFRANCHINO, J.L., MACINA, R.A., REYES, M.B., LEGUIZAMON, S., CAMARGO, M.E., ASLUND, L., PETERSON, U. AND FRASCH, A.C.C. (1988). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 30:27-34.
- ITAKURA, K; HIROSE, T; CREA, R; RIGGS, AD, HEYNEKER, HL; BOLIVAR, F AND BOYER, HW. (1977) *Science* 198 1056-1063.
- KAHN, S; VAN VOORHIS, WC AND EISEN, H. (1990). *J Exp Med*, 172, 589.
- KATZIN, AM AND COLLI, W. (1983). *Biochim Biophys Acta* 727, 403.
- KEMP, DJ; COPPEL, RL AND ANDERS, RF. (1987). *Annu Rev Microbiol*, 41, 181.
- KIERSZENBAUM, F. (1985). *Parasitol Today* 1, 4.
- KIERSZENBAUM, F. (1986). *J Parasitol* 72, 201.
- KIRCHHOFF, LV; ENGEL, JC; DVORAK, JA AND SHER, A. (1984). *Mol Biochem Parasitol*, 11, 81.
- KNOT, JA; SULLIVAN, CA AND WESTON A. (1988). *Eur J biochem* 174
- KRAEMER, G.R. AND IANDOLO J.J. (1990). *C. Microbiol.* 21:373-376.
- KREISWIRTH, BN; LOFDAHL, S; BETLEY, MJ; O'REILLY, M; SCHILIEVERT, PM; BERGDOLL, MS; NOVIK RP. (1983). *Nature* 305, 709.
- KRETTLI, AU. (1984). *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 79 (Suppl), 59.
- KRETTLI, A.U. AND BRENER, Z. (1982) *J. Immunol.* 128, 2009-2012
- KUNITZ, M (1939) *J Gen Physiol* 22, 429.
- KYTE, J AND DOOLITTLE, R (1982) *J Mol Biol* 157, 105.
- LAEMMLI, UK AND FAVRE, M. (1973) *J Mol Biol* 80 575-599.
- LAFAILLE, JJ (1989) *Mol Biochem. Parasitol*, 35 127.

LEGUIZAMON,MS; CAMPETELLA, DE; REYES,MB; IBANEZ,CF; BASOMBRIOMA; RINCON,J; ORN,A AND FRASCH,ACC.(1990). Parasitology, 102, 379.

LEVIN,MJ; MESRI,E; BENAROUS,R; LEVITUS,F; SCHIJMAN,AG; LEVY-YEYATI,P; CHIALE,PA; RUIZ,AM; KAHN,A; ROSEMBAUM,MB; TORRES,HN AND SEGURA SL. (1989) Am J Trop Med Hyg 41, 530.
LIEPNIEKS,JJ AND LIGHT,A. (1979). J Biol Chem 245, 1677.

LIGHT,A AND JANKSA,H.(1989). TIBS 14, 110-112.

LIMA-MARTINS,MV; SANCHEZ, GA; KRETTLI AU AND BRENER,Z (1985). Parasit. Immunol, 7, 367.

LINDMARK,R; THOREN-TOLLING,K AND SJOQUIST,J. (1983). J Immunol Methods 62 1.

LÖWENADLER,B; JANSSON,B; PALEUS,S; HOLMGREN,E; NILSSON,B; MOKS,T; PALM,G; JOSEPHSON,S; PHILIPSON,L; AND UHLEN. (1987). Gene 58, 87.

LÖWENADLER,B; NILSSON,B; ABRAHMSSEN,L; MOKS,T; LJUNGQVIST,L; HOLMGREN,E; PALEUS,S; JOSEPHSON,S; PHILIPSON,L AND UHLEN,M (1986). EMBO J 5, 2393.

MAINA,CV; RIGGS, PD; GRANDEA, AG III; SLATKO, BE; MORAN,LS; TAGLIAMONTE,JA, MCREYNOLDS,LA AND DI GUAN,C. (1988). Gene 74, 365-373.

MOKS,T; ABRAHMSSEN,L; E HOLMGREN,; M BILICH,;A OLSSON, ;G POHL,;C STERKY, ;H HULTBERG ;S JOSEPHSON,;A HOLMGREN,; H JORNVALL;UHLEN, M AND NILSSON L. (1987a) Biochemistry 26, 5239

MOKS,T; ABRAHMSSEN,L; NILSSON,B; HELLMAN,U; SJOQUIST,J; AND UHLEN,M. (1986).Eur J Biochem 14, 7487.

MOKS,T; ABRAHMSSEN,L; OSTERLOF,B; JOSEPHSON S; OSTLING,M; ENFORS, SO; PERSSON, SO; NILSSON,B AND UHLEN,M. (1987b) Bio/ Technol 5, 379.

MONACO,L; BOND,HM; HOWELL,KE AND CORTESE,R. (1987). EMBO J 6, 3253.

MORAGUCHI,A; KISIMOTO,T; KURITANI,T; WATANAKI,T AND YAMAMUJRA,Y. (1980). J Immunol 125, 564.

NAGAI,K AND THOGERSEN HC (1987) "Methods in Enzymology" Vol 153, 461-481.

NIELSEN,OJ; COSTA-GIOMI,P; WEINMANN,R; ERSLEV, AJ AND CARO,J (1988). J Immunol Methods 111, 1-9.

NILSSON,L ABRAHMSSEN,E AND UHLEN. (1985a). EMBO J 4 1075.

- NILSON,B; HOLMGREN,E; JOSEPHSON,S; GATENBECK,S AND UHLEN,M.
(1985b) Nucl Acids Res 13, 1151.
- NILSSON,B AND ABRAHMSSEN,L (1990). "Methods in Enzymology" vol
185 144-161.
- NILSSON,B. AND ABRAHMSSEN,L.(1990)."Methods in Enzymology".185
144-161, Academic Press,San Diego.
- NOGEIRA,N; UNKELESS,J AND COHN,Z. (1982). Proc Natl Acad Sci
USA, 29, 1259.
- OFFENSBERGER,W; WAHL,S; NEURATH,AR; PRICE,P; STRICK,N; KENT
SBH; CHRISTMAN, JK AND ACS,G.(1985).Proc Natl Acad Sci USA
82, 7540-7544.
- OKANLA,EO; STUMPF,JL AND DUSANIC,DG. (1982). Int J Parasitol,
12, 251.
- ONG,E; GILKES,NR; MILLER,RC JR; WARREN RAJ AND KILBURN, DG.
(1991). Enzyme Microb Technol. 13, 56-65
- ONG,E; GILKES,NR; WARREN RAJ; MILLER,RC JR AND KILBURN, DG
(1989a). Biol/Technol 7, 604-607.
- ONG,E; GREENWOOD JM; GILKES,NR; KILBURN,DG; MILLER RC JR AND
WARREN,RAJ. (1989b).Trens Biotechnol 7, 239-243.
- OROZCO,O; AFCHAIN,D; DISSOUS,C; RODRIGUEZ,C; OVLAQUE,G;
LEMESRE,JL; LOYENS,M AND CAPRON,A. (1984). Am J Trop Med Hyg,
33, 560.
- OUAISSI,MA; TAIBI,A; CORNETTE,J; VELGE,P; MARTY,B; LOYENS,M;
ESTEVA,M; RIZVI, FS AND CAPRON,A. (1990). Parasitology, 100,
115.
- DUCHTERLONY, O. (1958) Prog. Allergy, 5, 1.
- PETERSON,DS; FOUTS, DL AND MANNING, J. (1989) EMBO J, 8,
3911.
- PETRY,K AND EISEN,H. (1989). Parasitol Today 5, 111.
- PLAYFAIR,JHL; TAVERNE,J; BATE,CAW AND DE SOUZA, JB.(1990).
Immunol Today, 11, 25.
- POLLEVICK,GD; AFFRANCHINO,JL; FRASCH,ACC AND SANCHEZ, DO.
(1991). Mol Biochem Parasitol 47, 247.
- PORATH,J; CARLSSON,J; OLSSON,I AND BELFRAGE,G. (1975). Nature
258, 598-599.

- POWELL,IB; ACHEN,MC; HILLER,AJ AND DAVIDSON,BE. (1988). Appl Environ Microbiol 54, 655.
- PRIKETT, KS; AMBERG,DC AND HOPP,TP. (1989). BioTechniques 7, 580-589.
- RANDALL,LL AND HARDY,SJS (1986). Cell, 46, 921.
- REQUENA,JM (1988) Nucl Acids Res 16, 1393.
- REYES,MB; LORCA,M; MUNOZ,P AND FRASCH,ACC. (1990). Proc Natl Acad Sci USA. 87, 2846.
- RINDERKNECHT,E AND HUMBEL,RE. (1978). J Biol Chem 253, 8, 2769.
- RHOADS KRAEMER AND IANDOLO J. (1990). C Microbiol, 21, 373
- RODEY,GE; DAVIS,T AND QUIE PG. (1972). J Immunol 108, 178.
- RODITI,I; CARRINGTON,M AND TURNER,M. (1987). Nature 325, 272.
- RUIZ,AM; ESTEVA,M; SUBIAS,E; MORENO,M; CAMPANINI,ARD; VELAZQUEZ,E AND SEGURA EL. (1990). Mol Biochem Parasitol. 39, 117.
- SAKANE,T AND GREEN I. (1978). J Immunol vol 120, 1, 302.
- SAMBROOK,J.,FRITSCH,E.F.AND MANIATIS,T.(1989)."Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SASSENFELD, HM AND BREWER, SJ. (1984). Bio/Technol 2,76-81.
- SAUNDERS,CW; BANNER,CDB; FAHNESTOCK RS, LINDBERG,M; MIROT,MS; RHODES CS; RUDOLPH,CF; SCHMIDT,BI; THOMSON,LD; UHLEN,M AND M, GUYER. (1984) "Protein Transport and Secretion".p 329. Alan R. Liss, New York.
- SCHIJMAN, AG; DUSETTI,NJ; VAZQUEZ, MP; LAFORN,S; LEVY-YEYATI,P; AND LEVIN, MJ. (1990) Nucl Acid Res, 18, 3399.
- SCHNEIDER, A (1988). Science 241, 459.
- SCHOEMAKER,JM; BRASNETT AND MARSTON FAO. (1985) EMBO J 4, 775.
- SCOTT,MT AND SNARY,D. (1979). Nature, 282, 73.
- SCOTT,MT; (1981). Parasit Immunol 3, 209.
- SCOTT,MT; BAHR,G; MODDABER,F; AFCHAIN,D AND CHEDID,L.(1984). Int Archs Allergy Appl Immun. 74, 373.

- SCOTT,MT; NEAL,RA AND WOODS,NC. (1985). Trans R Soc Trop Med Hyg, 79, 451.
- SHERF,A; MATTEI,D AND SCHREIBER,M. (1990). J Immunol Methods 128, 81-87.
- SHERWOOD,R. (1991). TIBTECH 91-3.
- SHINE,J; FETTES,I; LANN,CY; ROBERTS,JL AND BAXTER JD. (1980) Nature 285,456-461.
- SHUMAN,HA; SILHAVY,TJ AND BECKWITH JR. (1980). J Biol Chem 255, 168-174.
- SJODAHL,J. (1977). Eur J Biochem 73, 343.
- SJOQUIST,J; MOVITZ,J; JOHANSSON,IB AND HJELM,H. (1972). Eur J Biochem 30, 190.
- SMITH, JC; DERBYSHIRE,RB; COOK,E; DUNTHORNE,L; VINEY J; BREWER, SJ; SASSENFELD, HM AND BELL, LD, (1984).Gene 32, 321-327.
- SMITH,DB AND JOHNSON KS (1988). Gene 67, 31-40.
- SNARY,D AND HUDSON,L. (1979). FEBS Lett, 100, 166.
- SNARY,D. (1983). Trans, R. Soc Trop Med Hyg. 77; 126.
- SNARY,D; FERGUSON,MAJ; SCOTT,MT AND ALLEN AK. (1981). Mol Biochem Parasitol, 3, 343.
- SOUTO-PADRON,T; CAMPETELLA,OE; CAZZULO,JJ AND DE SOUZA. (1991). J Cell Sci, 96 485.
- STANLEY,KK AND LUZIO,JP. (1984). EMBO J 3, 1429-1434.
- STEERS,E JR CUATRECASAS,P AND POLLARD,HB. (1971). J Biol Chem 246, 196-200.
- STRUK,DK; MARATEA,D AND YOUNG,R. (1985). J Mol Appl Genet 3, 18-25.
- TEIXEIRA,MMG AND YOSHIDA,N. (1986). Mol Biochem Parasitol, 18,271.
- TRISCHMANN,TM. (1984). Parasite Immunol, 6, 561.
- UHLEN,M; GUSS,B; NILSSON,B; GOTZ,F AND LINDBERG,M. (1984). J Bacteriol 159, 713.
- UHLEN,M AND MOKS,T. (1990) "Methods in Enzymology" Vol 185 129-143.

UHLEN,M; GUSS,B; NILSSON,B; GATENBECK,S; PHILIPSON,L AND LINDBERG,M. (1984). J Biol Chem 259 1695.

ULLMANN,A (1984).Gene 29, 27-31.

VALERIE,K; FRONKO,G; LONG,W; HENDERSON,EE; NILSSON,B; UHLEN, M; DE RIEL,JK. (1987). Gene 58, 99.

WALLIS, AE AND MCMASTER,WR. (1987). Exp Med 166, 1814.

WELLING, GW; WEIJER, WJ; VAN DER ZEE,R AND WELLING-WESTER,S. (1985). FEBS Letters 188, 2, 215.

WILCHEK AND PATCHORNIK (1962). J Am Chem Soc, 84, 4613.

WRIGHTSMAN,R; LEON,W AND MANNING,J. (1986). Infect Immun, 53, 235.

YANSURA,DG (1990) "Methods in Enzymology" Vol 185, 161-167.

YOSHIDA, N.(1986) Exp. Parasitol, 61, 184-191

YOSHIDA,N; MORTARA,RA; ARAGUTHK,MF; GONZALEZ,J AND RUSSO,M. (1989). Infect Immun 57; 1663.

ZABEAU,M AND STANLEY,K. (1982). EMBO J 1, 1217.

ZINGALES, B.,KATZIN, A.M., ARRUDA, M.V. AND COLLI, W. (1985) Mol. Biochem. Parasitol.16, 21-34.

ZWEERINK,H.J.,WESTON,H.D., ANDERSEN,O.F.,GARBER,S.S.AND HAYES ME.C. (1984). Infect. Immun.46,826-8303.

ZWEERINK,HJ; WESTON,HD; ANDERSEN,OF; GARBER,SS AND HAYES,EC. (1984). Infect Immun, 46, 826.

Dr. VICTORE NAHMOD
M. P. 20989