

UCH - FC
Biotecnología
Q. 51
C. 1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**DESARROLLO DE UNA POSIBLE VACUNA ORAL VIVA CONTRA
Helicobacter pylori PARA EVALUAR EN RATONES**

Memoria de Título

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Marco Antonio Olmos Mejías

Junio, 2009
Santiago – Chile

Director de la Memoria de Título: Dr. Alejandro Venegas
Profesor patrocinante: Dra. María Rosa Bono



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“DESARROLLO DE UNA POSIBLE VACUNA ORAL VIVA CONTRA *Helicobacter pylori* PARA EVALUAR EN RATONES”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

MARCO ANTONIO OLMOS MEJÍAS

Dr. Alejandro Venegas Esparza
Director Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Patrocinante

Comisión de Evaluación

Dra. Rosa Alba Lagos Mónaco
Presidenta Comisión

Dr. Mario Roseblatt Silber
Evaluador

Santiago de Chile, Junio de 2009

RESUMEN

Helicobacter pylori coloniza el estómago del 50% de la población mundial, causando gastritis crónica, úlcera e incluso cáncer gástrico. Dado el creciente número de cepas resistentes a antibióticos, la formulación de una vacuna es de gran relevancia. Se ha demostrado que antígenos expuestos en membrana inducen mayor protección. El objetivo de este trabajo fue construir y ensayar la efectividad de cepas de *Salmonella* atenuadas que expresan antígenos de *H. pylori*, clonados por PCR y fusionados al autotransportador de VacA (denominado CT2), que expone la proteína híbrida en membrana externa, en el modelo murino de infección con *H. pylori*. Los antígenos elegidos fueron HpaA, una adhesina, y dos fragmentos de CagA, denominados A17C y NT. Se comprobó por digestión con tripsina de células enteras, que las quimeras están expuestas al exterior. La expresión es estable incluso después de eliminar el inductor del medio. Con la cepa de *S. typhimurium* que expresa c-HpaA/CT2 se inoculó ratones por vía oral. Luego de tres inoculaciones primarias y una de refuerzo, se desafió los ratones con *H. pylori* P76. Se midió por ELISA el título de anticuerpos y se determinó la colonización estomacal. Se comprobó que los ratones vacunados presentan una respuesta sérica significativamente mayor que los controles, aunque no se obtuvo diferencias significativas de colonización estomacal por parte de *H. pylori*. Se atribuye la falta de efectividad a la toxicidad que presentan las proteínas híbridas con CT2 en la cepa vacuna, y se propone, para futuros estudios, utilizar una versión modificada de CT2, en la que la secuencia señal de reconocimiento por chaperonas de membrana externa haya sido reemplazada.



ABSTRACT

Helicobacter pylori colonizes the stomach of 50% global population, being the cause of chronic gastritis, peptic ulcer and even gastric cancer. Given the increasing number of antibiotic resistant strains, a vaccine formulation is of great relevance. It has been shown that membrane exposed antigens induce greater protection. The aim of this work was to construct and assay the effectiveness of attenuated *Salmonella* strains, expressing antigens of *H. pylori*, cloned by PCR and fused to the VacA autotransporter (designated CT2), which exposes them in the outer membrane, in the murine infection model with *H. pylori*. The chosen antigens were HpaA, an adhesin, and two fragments of CagA, designated A17C and NT. Exposure of the hybrids was assessed by whole cell trypsin digestion. The expression was stable even after removal of the inductor. Mice were orally inoculated with c-HpaA/CT2 expressing strain. After three primary inoculations, and one booster, mice were challenged with *H. pylori* P76. Sera antibody titer was measured by ELISA, and gastric colonization was determined. We have shown that vaccinated mice present higher seric immune response than controls, though there were no significant differences in gastric *H. pylori* colonization. We think the lack of protection is associated with the toxicity that CT2 protein hybrids pose to the vaccine strain, since CT2 moiety may not be appropriately assembled into the bacterial membrane (i.e. not properly assisted by chaperons). We propose that future studies should be done by using a modified version of CT2, in which the membrane chaperone recognition sequence has been replaced by the corresponding host sequence.



BIOGRAFÍA



Marco Olmos nació el 26 de Abril de 1982. Egresó del Instituto Nacional el año 1999. Ingresó a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2000, egresando como Licenciado en Biotecnología Molecular el año 2005. Ese año inicia su tesis de pregrado en el laboratorio del Dr. Alejandro Venegas en la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica, patrocinado por la Dra. María Rosa Bono de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Presenta su tesis de pregrado el año 2009, durante el desarrollo de sus estudios de postgrado, habiendo ingresado al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Mención Genética Molecular y Microbiología de la P. Universidad Católica el año 2007.



Para mi Princesita

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a cada una de las personas que apoyaron, aportaron, o estuvieron involucradas en alguna de las múltiples etapas del desarrollo de esta tesis me tomaría casi tantas hojas como tiene este trabajo, por lo que es imposible. Aún así, hay personas que merecen especial atención, que son las que incluyo aquí.

Todo trabajo empieza no sólo por un alumno, sino que también por un tutor, y estoy muy agradecido de haber podido encontrar un tutor como el Dr. Venegas, opinión que, creo yo, comparten todos mis compañeros de laboratorio. Difícil es encontrar un tutor con tan buena disposición a ayudarte y que pueda generar un ambiente de trabajo tan agradable como el que se genera en nuestro laboratorio. Al mismo tiempo, el ambiente de trabajo de trabajo del laboratorio siempre nos ha hecho sentir apoyados a todos quienes pasamos por él, razón por la cual también me encuentro agradecido de mis compañeros de trabajo, tanto los presentes como los pasados, que con su apoyo mutuo han ayudado a que este trabajo por fin llegue a su finalización.

También debo agradecer a mi familia, mi mamá y mis hermanos, que me han estado soportando todo este tiempo, y me han apoyado ante cualquier dificultad que surja, ya sea por la acción o el pensamiento. Sé que puedo contar con ellos.

Y, finalmente, todo mi agradecimiento a Tami, mi novia y compañera. Sin tu apoyo, nunca habría llegado aquí. Es gracias a ti que ahora escribo esto. Siempre serás lo más importante del mundo. Mi mundo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS



	Página
- Introducción	1
- Hipótesis	13
- Objetivos	14
- Materiales y Métodos	17
- Resultados	37
- Discusión	59
- Conclusiones	75
- Referencias	76
- Anexo 1	83
- Anexo 2	84

INDICE DE TABLAS

	Página
- Tabla I: <i>Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como partidores para la amplificación de las regiones utilizadas como antígeno</i>	20
- Tabla II: <i>Niveles de citoquinas en homogeneizados de estómago de ratones vacunados y controles</i>	58





ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
- Figura 1: Marcadores de peso molecular utilizados en este trabajo	21
- Figura 2: Clonamiento de los fragmentos de CagA en pGEM-T easy	38
- Figura 3: Construcción de los híbridos de fragmentos A17C y NT de CagA y CT2	40
- Figura 4: Comprobación de la presencia de los constructos híbridos en pET27b	41
- Figura 5: Expresión de los híbridos en JM109 (DE3)	43
- Figura 6: Construcción del plásmido pET27b c-hpaA/CT2 con el gen <i>asd</i> en lugar del gen <i>nptII</i> , e incorporación a <i>S. typhimurium</i> χ 4550 que contiene el plásmido pGP1-2	46
- Figura 7: Comprobación de la inserción del gen <i>asd</i> en pET27b NT /CT2	47
- Figura 8: Expresión de híbridos NTG/CT2 y NTJ/CT2 en la cepa vacuna χ 4550 que contiene el plásmido pGP1-2	48
- Figura 9: Crecimiento de los clones que expresan quimeras con CT2	50
- Figura 10: Expresión de los híbridos luego de remover el inductor (IPTG) del medio	51
- Figura 11: Monoinducción a 42°C o IPTG1mM a 37°C de <i>S. typhimurium</i> χ 4550 pGP1-2 pET27b <i>asd</i> c-hpaA/CT2	53
- Figura 12: Localización de híbridos c-HpaA/CT2 y NT/CT2 en la superficie de <i>S. typhimurium</i> χ 4550 por digestibilidad de bacterias enteras ante tripsina e inmunodetección del antígeno	54

- Figura 13: Comparación del título de anticuerpos séricos anti HpaA y colonización estomacal por *H. pylori* P76 de ratones inoculados con la cepa vacuna que expresa c-HpaA/CT2 o los controles, y posteriormente desafiados con *H. pylori* P76 56
- Figura 14. Secuencia de clones pET27b A17C/CT2 traducida 83
- Figura 15: Alineamiento de un clon de *E. coli* que tiene clonado el híbrido NTG/CT2 en pET27b, con la secuencia publicada de cagA de J99 84
- Figura 16: La cepa J99 presenta una inserción poco común de 4 aminoácidos 85



LISTA DE ABREVIATURAS

A17C	Fragmento de amplificación de CagA con los partidores que comprenden los aminoácido 834 al 1047
A17CG	Fragmento de amplificación de CagA de la cepa G27 con los partidores que comprenden los aminoácido 834 al 1047 de la cepa J99
A17CJ	Fragmento de amplificación de CagA de la cepa J99 con los partidores que comprenden los aminoácido 834 al 1047 de la cepa J99
BHI	Infusión de Cerebro y Corazón
BSA	Seroalbúmina de bovino
c-hpaA	Gen que codifica para la proteína HpaA, a cuyo N-terminal se ha fusionado un marcador c – myc
c-HpaA	Producto de c-hpaA
CT	Carboxilo terminal
CT2	Fragmento carboxilo terminal de VacA de <i>H. pylori</i> 60190 que comprende los últimos 436 aminoácidos
DAP	Ácido diamino pimélico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
HP0	Proteína hipotética de <i>H. pylori</i> con un dominio DsbG, correspondiente al producto del gen HP0231 de la cepa 60190
IL	Interleuquina
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil β – D – tiogalactopiranósido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NT	Fragmento resultante de amplificación de CagA con los partidores que comprenden los aminoácidos 100 a 288
NTG	Fragmento de amplificación de CagA de la cepa G27 con los partidores que comprenden los aminoácidos 100 a 288 de la cepa J99
NTJ	Fragmento de amplificación de CagA de la cepa J99 con los partidores que comprenden los aminoácidos 100 a 288 de la cepa J99
PBS	Tampón fosfato salino (Na ₂ HPO ₄ 8,1mM; KH ₂ PO ₄ 1,47mM; NaCl 0,8%; KCl 0,02%)
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal de bovino
TMB	Tetra metil bencidina
TLR	Receptor tipo Toll
UFC	Unidades formadoras de colonias
WB	Western Blot

X-gal

5 - bromo 4 - cloro 3 - indolil β - D - galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, cuyo nicho ecológico es el antro, en el estómago humano. Fue descrita en 1899 como un microorganismo espiralado presente en el estómago, por un investigador clínico polaco, Walery Jaworski (Konturek, 2003), quien la denominó *Vibrio rugula*. Jaworsky especuló que podría estar relacionada a algunas disfunciones gástricas, como las úlceras. Fue redescubierta en 1982 por Marshall y Warren, del Hospital Royal Perth, en Perth, Australia (Marshall, 1983; Marshall y Warren, 1984). También hubo varios otros reportes de la presencia de bacterias en el estómago en los 83 años que transcurrieron entre ambos descubrimientos (Konturek, 2003). El trabajo de Marshall y Warren con *H. pylori* les valió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2005.

Helicobacter pylori posee 6 flagelos polares que le permiten atravesar la capa mucosa y acercarse a las células epiteliales, donde la acidez es menor, ya que existe un gradiente de pH entre el lumen gástrico y las células epiteliales. Además, para neutralizar efectivamente la acidez estomacal, esta bacteria posee la enzima ureasa, que convierte la urea en amonio, subiendo el pH en su entorno inmediato. La urea necesaria para fabricar amonio a partir de arginina la proporciona la enzima arginasa. Para evitar su eliminación mediante peristalsis, *H. pylori* es capaz de adherirse a la superficie de las células epiteliales, a través de proteínas de unión (adhesinas) tales como BabA y SabA (Ilver y cols., 1998).

La presencia de *H. pylori* se ha relacionado con numerosas enfermedades, como la gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico. En el año 1994 la OMS clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno de tipo I, siendo una de las pocas bacterias, junto con *Helicobacter hepaticus*, que detenta dicha categoría actualmente. En base a numerosos estudios se estima que el 50% de la población mundial es hospedera de esta bacteria. En Chile, se calcula que el 73% de la población se encuentra infectada por ella, aunque la mayoría no presenta síntomas de enfermedad (Hopkins y cols., 1993; Figueroa y cols., 1997; Guiraldes y cols., 2002, Fischbach y cols., 2005; Kupcinskas y Melfertheiner, 2005, Ferreccio y cols, 2007). La vía de transmisión no está claramente definida, aunque se cree que podría ser oral – oral o fecal – oral. Se ha encontrado que *H. pylori* podría estar contaminando vegetales de consumo humano, el agua o incluso tener como reservorio el interior de otros organismos, como las levaduras y amebas (Hopkins y cols., 1993; Winiecka-Krusnell y cols., 2002; Siavoshi y cols., 2005).

Helicobacter pylori es la bacteria genéticamente más diversa estudiada a la fecha, cuyas cepas difieren en tamaño de genoma, orden de sus genes, contenido genético y perfil alélico de ciertos genes (Cooke y cols., 2005). Lo anterior se debe a mecanismos de reordenamiento genético tales como recombinación intragenómica, variación de fase y transformación natural, que *H. pylori* desarrolla en alta tasa (Shan-Rui y cols., 1998; Suerbaum y cols., 1998; Robinson y cols., 2005). Estas características, junto con la presencia de procesos tales como la variación antigénica y la secreción de proteínas específicas, se relacionan con la

alta capacidad de *H. pylori* para producir una infección persistente durante décadas, si no la vida completa de su hospedador (Baldari y cols., 2005).

Una de las razones por la que *Helicobacter pylori* es capaz de permanecer décadas en su hospedador es su capacidad para evadir tanto la respuesta inmune innata como la adquirida. En los epitelios se desencadena la respuesta inmune innata, a través de receptores que reconocen principalmente patrones moleculares asociados a patógenos (denominados PAMPs). Entre los PAMPs más comúnmente reconocidos se encuentra el LPS y la flagelina bacterianos. En *H. pylori*, estos dos componentes han evolucionado de manera que son pobremente reconocidos y, por ende, facultan a esta bacteria para evadir parcialmente la respuesta inmune innata (Moran, 1999; Lee y cols., 2003). Sin embargo, *H. pylori* se ve beneficiada nutricionalmente por la producción de una cierta respuesta inmune, por lo que desencadena algunos mecanismos de defensa, que a la larga favorecen la infección; por ejemplo, se produce disrupción de la capa epitelial y con ello liberación de nutrientes a la mucosa. Además, la inflamación del epitelio produce un aumento de la capa mucosa, incrementando la superficie de residencia de este patógeno, favorecida también por el incremento de pH respecto al lumen.

Entre los mecanismos que se desencadenan con la respuesta inmune innata se encuentra la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. *H. pylori* activa la producción de especies reactivas de

oxígeno (ROs) mediante la proteína activadora de neutrófilos (NAP), y se defiende de ellas mediante la producción de enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y quinona reductasa dependiente de NADPH (Baldari y cols., 2005).

Los macrófagos producen también óxido nítrico (NO), que es tóxico tanto para el epitelio como para la bacteria, produciendo daño y apoptosis, eventos que resultan beneficiosos para *H. pylori*. El NO se produce a partir de arginina, mediante la óxido nítrico sintetasa inducible, iNOS. Para reducir el efecto del NO, *H. pylori* produce la enzima arginasa, que utiliza el mismo sustrato que iNOS, la arginina, para producir ornitina y urea (que posteriormente será utilizada para generar amonio y subir el pH), de esta manera, la bacteria baja las reservas de arginina disponibles externamente para la síntesis de NO por parte de la célula eucarionte (Gobert y cols., 2001). Además, este patógeno es capaz de inducir la producción de arginasa II en los macrófagos, reduciendo aún más los niveles de NO (Gobert y cols., 2002). Curiosamente, a pesar que *H. pylori* se define como una bacteria extracelular, es capaz de resistir más tiempo que otras bacterias Gram negativas en el interior del fagosoma. La bacteria se acumula en *macrosomas*, grandes vesículas compuestas de la unión de varios fagosomas, y puede ser liberada luego de la apoptosis del macrófago (Chaturvedi y cols., 2004).

Para lograr una infección persistente, los patógenos deben ser capaces de controlar o evadir la respuesta inmune adquirida. Para ello, *H. pylori* ha desarrollado evolutivamente diversos y complejos mecanismos, que involucran

cambios en la presentación de antígenos de la superficie bacteriana e interferencia en las células del sistema inmune del hospedador. Un factor de importancia lo constituye la toxina vacuolizante, VacA, cuya presencia se correlaciona con la gravedad del daño epitelial debido a *H. pylori* (Murakita y cols., 1994; Atherton y cols., 1995). Esta proteína es sintetizada como un precursor de 140 kDa que contiene un péptido-sígnal de destinación a periplasma, dependiente de la vía Sec (Phadnis y cols., 1994). Mediante un proceso secretor autopromovido, el precursor de VacA es capaz de insertarse en la membrana externa y liberar desde ahí un producto de 95 kDa, que sufre una proteólisis adicional para generar la toxina, formada por dos subunidades derivadas de este producto (Fisher y cols., 2001). La citotoxina madura se inserta en la membrana de la célula epitelial y es internalizada dentro de vacuolas. VacA tiene diversos efectos en el epitelio del hospedador, siendo el más notorio de ellos la vacuolización y lisis de las células epiteliales. Previo a la internalización, VacA forma canales en la membrana de la célula epitelial, permitiendo la salida de nutrientes de importancia para *H. pylori*, tales como piruvato, urea y bicarbonato. VacA causa disrupción de las *tight junctions*, permitiendo la salida de iones Fe^{+3} , Ni^{+2} y moléculas pequeñas, como manitol y sacarosa, hacia el ambiente pobre en nutrientes de la mucosa epitelial (Tombola y cols., 2001).

VacA, además de tener efectos en la capa epitelial, tiene función moduladora sobre células del sistema inmune. VacA es capaz de interferir en el procesamiento y presentación de antígenos por parte de los linfocitos B (Molinari y

cols., 1998) y participa activamente en la modulación de la respuesta de linfocitos T. VacA previene la activación y proliferación de linfocitos T a diferentes niveles. VacA es capaz de causar un arresto del ciclo celular en G₁/S, mediante dos vías diferentes. Una vía depende de la formación de canales iónicos que depolarizan el linfocito, impidiendo el flujo de calcio al citoplasma y la activación de calcineurina, que controla, a su vez, la acción del factor de transcripción NFAT, elemento clave en diversos procesos celulares (Gebert y cols., 2003; Boncristiano. y cols. 2003). La segunda vía involucra la activación de la GTPasa Rac y produce, finalmente, la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de p38, una quinasa de estrés. Se piensa que la disrupción del citoesqueleto afecta el ordenamiento de F-actina en la sinapsis inmunológica y previene la activación del linfocito (Boncristiano. y cols. 2003). Otros estudios sugieren que VacA es capaz de impedir la expansión clonal de las células T activadas mediante una vía independiente de la secreción de IL-2, sin afectar la sobrevivencia de las células inducidas por esta citoquina (Sundrud y cols., 2004).

Se ha demostrado recientemente que la proteína activadora de neutrófilos, NAP, modula la respuesta inmune adquirida a través de la innata. Se demostró que NAP, además de inducir la producción de ROs y la adhesión de los neutrófilos a células endoteliales, es reconocida por TLR 2, e induce la expresión de IL-12 e IL-23 en neutrófilos y monocitos (Amedei y cols., 2006). Esto determina la generación de una respuesta Th1, que no erradica la infección, sino que, al contrario, beneficia la sobrevivencia de la bacteria.

La gran capacidad de persistencia de *H. pylori*, el gran número de personas infectadas por ella, tanto en el mundo como en nuestro país, y el aumento de las cepas resistentes a antibióticos (Chmiela y Michetti, 2006; Koletzco y cols., 2006) hacen que el desarrollo de una vacuna con la cual combatirla sea de gran relevancia.

En vista que *H. pylori* coloniza el epitelio estomacal, el tipo de vacuna más recomendable es una oral, que sea capaz de inducir una respuesta de tipo mucosal, y no sólo sérica. Para ello se ha propuesto utilizar cepas atenuadas de ciertas bacterias, como *Salmonella typhimurium*, que expresen antígenos contra los que se desee crear inmunidad. El modelo animal para los estudios previos es el ratón, en el cual puede utilizarse como vector *Salmonella typhimurium* (Corthesy-Theulaz y cols., 1998; Gomez-Duarte y cols., 1998). La infección con *Salmonella typhimurium* tipo silvestre causa en el ratón una enfermedad similar a la observada en humanos luego de infección por *Salmonella typhi*, por lo que este modelo tiene perspectivas interesantes. Entre las proteínas de *H. pylori* se han propuesto varios antígenos posibles, como es HpaA, una adhesina que en estudios previos ha demostrado ser inmunogénica (Volland y cols., 2003) y CagA, una proteína altamente inmunogénica que es inyectada por la bacteria en las células epiteliales, y que ha sido relacionada con un mayor riesgo de cáncer gástrico (Nomura y cols., 1995; Vogelmann y cols., 1997).

La adhesina HpaA fue descubierta en 1988 como una hemoaglutinina fibrilar que une N-acetil neuraminil-lactosa (Evans y cols., 1988) y posee afinidad por fetuína (una sialoglicoproteína de suero). HpaA tiene un peso de 30kDa, es una lipoproteína y su función específica es actualmente desconocida, aunque se piensa que, junto a BabA, participa en la unión al epitelio gástrico. HpaA es una proteína altamente conservada y su secuencia no presenta homología con proteínas de ninguna otra especie (Volland y cols., 2002). Se ha ubicado a HpaA tanto en el citoplasma como en la membrana externa y en la vaina flagelar, y actualmente se piensa que esta proteína está expuesta en la superficie bacteriana (Blom y cols., 2001). Se ha demostrado que la expresión génica de *hpaA* en distintas cepas de *H. pylori* es similar, siendo la secuencia aminoacídica bastante conservada, si bien las cepas presentan variaciones en la localización y la cantidad de proteína expuesta en la superficie bacteriana (Lundström y cols., 2004).

Se ha demostrado que HpaA es capaz de inducir respuesta inmune, pues promueve la maduración de células dendríticas humanas y la producción de interleuquinas 10 y 12. Además, se ha sugerido HpaA como un buen marcador de la presencia de *H. pylori*, dado que solo pacientes infectados presentan seroreactividad contra ella (Volland y cols., 2003; Díaz y cols., 2006, datos no publicados). Actualmente hay investigaciones en curso para desarrollar vacunas contra *H. pylori* utilizando HpaA₁ purificada, y se ha comprobado que en un modelo murino esta proteína es capaz de inducir sobre un 75% de protección al ser

administrada junto a un adyuvante como LTB o CTB (subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* o subunidad B de la toxina del cólera, respectivamente). Es más, se ha demostrado que si HpaA se utiliza en combinación con otro antígeno, como UreB, es posible obtener más de un 90% de eficiencia en protección (Mao y cols., 2005). Recientemente, se ha descubierto, al utilizar mutantes nulos para el gen *hpaA* en experimentos de desafío en ratones, que éstos son incapaces de colonizar la mucosa gástrica (Carlsohn y cols., 2006), lo que resalta la importancia de HpaA en la infección por parte de *H. pylori*, y avala aún más su uso como posible antígeno en el desarrollo de una vacuna.

Algunas cepas de *Helicobacter pylori* presentan un islote de patogenicidad (*cag* PAI), relacionado con un mayor riesgo de producir úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico (Blaser, 2006). Esta es una región de entre 35 y 40 kb, inserta en el gen que codifica para glutamato racemasa, en el cromosoma de la bacteria. El islote contiene 31 genes, 6 de los cuales tienen homología con el sistema de secreción tipo IV de *Agrobacterium tumefaciens*. En *H. pylori* este sistema transloca directamente la proteína CagA a la célula epitelial del hospedero (Backert y cols., 2000). CagA es causal de una variedad de fenómenos en la célula epitelial, entre ellos, desfosforilación de proteínas propias del hospedador, inducción de motilidad, redistribución del citoesqueleto (produciendo, en cultivo, un fenotipo celular alargado denominado *colibri*) y aumento de la proliferación celular. Esta molécula tiene un peso de entre 128 y 140 kDa, su gen tiene un tamaño de aproximadamente 3500 pb, dependiendo de la cepa. La proteína CagA tiene tres

regiones principales: la región N – terminal de aproximadamente 2200 pb; una región media denominada A17, de aproximadamente 800-1000 pb, que contiene motivos fosforilables (EPIYA), y la región C – terminal de 500 pb, que es la más variable en secuencia.

La proteína CagA, una vez transportada al interior de la célula epitelial, se localiza en la superficie interior de la membrana plasmática y es fosforilada en la tirosina de los motivos EPIYA por quinasas de la familia Src (Stein y cols., 2002). CagA fosforilada se une a una tirosín- fosfatasa (SHP-2), con dominio SH2, estimulando su actividad. SHP-2 está relacionada con movilidad y crecimiento celular, y se ha comprobado que mutaciones que incrementan la función en esta proteína son causales de una variedad de alteraciones. Esto indica que SHP-2 es una oncoproteína humana y sugiere que la desregulación de ésta, mediada por CagA, juega un importante papel en la carcinogénesis gástrica (Yokoyama y cols., 2005). En células en cultivo, el efecto de la fosforilación de CagA puede ser observado por la generación del fenotipo alargado denominado *colibrí* (Segal y cols., 1999). Además, CagA es capaz de interactuar con otras proteínas, de manera independiente de la fosforilación. Entre éstas se ha descrito su interacción con Grb-2 (proteína de unión al receptor del factor de crecimiento epidermal 2), el receptor c-Met (que une el factor de crecimiento de hepatocitos), fosfolipasa Cy, y con JAM y ZO-1 (proteínas de *tight junction*). La interacción entre CagA y las primeras tres moléculas tiene un efecto en la motilidad celular, mientras que la interacción con las últimas causa destrucción de la hermeticidad

de la unión intercelular del epitelio (Bourzac y Guillemin, 2005). En resumen, CagA actúa como una proteína bacteriana de anclaje y adaptación, que recluta múltiples proteínas celulares del hospedador y modifica una variedad de funciones de la célula epitelial. Recientemente, mediante estudios de transfección de células epiteliales AGS con segmentos del gen *cagA* que difieren en el contenido y origen (occidental u oriental) de los motivos EPIYA, se ha determinado que los 2 primeros EPIYAS (A y B) participan en la unión de CagA a la membrana plasmática, paso necesario para ejercer sus diversas actividades, pero que estos dominios no requieren estar fosforilados en el residuo de tirosina para este anclaje a membrana (Higashi y cols., 2005).

Puesto que CagA es causal de diversos daños en el epitelio, el uso como antígeno de la forma completa es cuestionable. Por tal razón, para fines de este trabajo se eligieron dos sectores de la proteína, que fueron clonados independientemente. Estos sectores comprenden un fragmento del extremo N – terminal y un fragmento que contiene las regiones A17 y el extremo C – terminal de la proteína. El primero se ha designado NT y consiste en 188 aminoácidos (cálculo basado en la secuencia de CagA de la cepa J99), entre los cuales se encuentra un motivo de fosforilación para quinasas de eucariontes (Y122). El segundo fragmento se ha designado A17C y comprende desde el aminoácido 834 al 1047 (cálculo también basado en la secuencia de la cepa J99), incluyendo las secuencias de fosforilación EPIYA. Para realizar una comparación entre la efectividad de CagA como antígeno y su efectividad como efector en la célula

epitelial, se utilizaron en este trabajo proteínas de dos cepas diferentes de *H. pylori*, J99 y G27. En la cepa J99 se ha encontrado mutaciones en codones importantes de los sitios de fosforilación, lo que hace que CagA de esta cepa no sea fosforilable en la célula epitelial y no cause el fenotipo *colibrí* en células en cultivo, mientras que la cepa G27 tiene un CagA fosforilable que presenta alta toxicidad en dichas células (Backert y cols., 2000).

Se ha demostrado que la expresión de antígenos en la membrana externa de bacterias Gram negativas atenuadas es más eficiente para producir protección que la expresión citoplásmica convencional de ellos (Rizos y cols., 2003). Ha resultado de interés el hecho que el fragmento carboxilo terminal (CT) de la proteína VacA, responsable del transporte al exterior de la toxina madura, sea capaz de insertarse por sí solo en la membrana externa, aunque requiere de un péptido señal para atravesar la membrana interna y alcanzar el periplasma (Fisher y cols., 2001). Utilizando esta característica, se ha propuesto utilizarlo como un método de expresión heteróloga de antígenos en la superficie de cepas que puedan ser usadas como vacuna.

Normalmente, al transformar una cepa con un plásmido de interés, se selecciona su permanencia en la bacteria utilizando un marcador de resistencia a algún antibiótico; sin embargo, si la cepa va a ser utilizada como vacuna en humanos, esto no es recomendable, puesto que se requeriría de la administración simultánea de la vacuna y el antibiótico. Esto no es económicamente atractivo ni

éticamente justificable y, además, presenta el riesgo de permitir transferencia de genes de resistencia a antibióticos en bacterias residentes en el hospedero, lo que puede dificultar futuros tratamientos de otras enfermedades. También representa un riesgo ecológico al liberar una bacteria resistente a antibióticos al medio ambiente. Por ello, se prefiere realizar los constructos utilizando un marcador metabólico, es decir, un gen que complemente una mutación metabólica preexistente en la cepa vacuna. En este trabajo, se utilizará el gen *asd*, que codifica para la enzima aspartato semialdehído deshidrogenasa, esencial en la vía de síntesis de ciertos aminoácidos (lisina, metionina y treonina) y del ácido diamino pimélico (DAP), componente del péptido glicán o mureína. Además, es imprescindible que la cepa vacuna no sea virulenta, por lo que se utilizará una cepa de *Salmonella typhimurium* atenuada.

Hipótesis

La cepa de *Salmonella typhimurium* χ 4550, transformada con cada una de las construcciones híbridas: pET27b A17C/CT2 *asd*, pET27b NT/CT2 *asd* o pET27b c-HpaA/CT2 *asd*, expresa y presenta en membrana los productos de dichas construcciones e induce, con al menos uno de los híbridos, una respuesta inmune adquirida contra *Helicobacter pylori* en el modelo murino, constituyendo un potencial prototipo de vacuna contra este patógeno.

Objetivos Generales

- 1.- Clonar los fragmentos A17C y NT de CagA, fusionarlos a CT2 y ligarlos en el vector de expresión pET27b, para luego transformar la construcción en *Escherichia coli*.
- 2.- Insertar el marcador metabólico *asd* en las construcciones híbridas pET27b A17C/CT2, pET27b NT/CT2 y pET27b c-HpaA/CT2 (ya disponible)
- 3.- Transformar las construcciones híbridas en *Salmonella typhimurium* χ 4550/pGP1-2, para luego verificar su expresión.
- 4.- Inocular ratones con la cepa vacuna que expresa las construcciones híbridas ya obtenidas y evaluar su efectividad en un ensayo de desafío y colonización por *H. pylori*.

Objetivos específicos

- 1.1.- Amplificar por PCR los fragmentos A17C y NT, ligarlos al vector pGEM-T y obtener clones con cada una de estas construcciones.
- 1.2.- A partir de los clones obtenidos subclonar en *E. coli* DH5 α las 2 construcciones en pET27b, fusionadas a CT2 y verificar su diseño mediante PCR y digestión con enzimas de restricción.

1.3.- Subclonar las construcciones en *E. coli* JM109(DE3) y verificar su expresión mediante inducción con IPTG y Western blot.

2.1.- Digerir con la enzima Sma I o Nru I (sitio presente en el cassette de resistencia a kanamicina) las construcciones pET27b A17C/CT2, pET27b NT/CT2 y pET27b c-HpaA/CT2 y ligar el gen *asd*, con su propio promotor, a las construcciones plasmidiales en su forma lineal.

2.2.- Transformar *E. coli* χ 6212 (Δ *asd*) con los productos de las ligaciones anteriores y seleccionar los clones en medio de cultivo sin DAP.

2.4.- Verificar la presencia del gen *asd* en las construcciones mediante PCR y/o digestión enzimática.

3.1.- Realizar extracción de plásmidos de los clones obtenidos en χ 6212 que presenten las construcciones y transformar con éstos la cepa χ 4550/pGP1-2

3.2.- En los clones ya aislados, inducir con IPTG, y por incubación a 42°C, la expresión de las proteínas híbridas y verificarla mediante Western blot.

3.3.- Construir una curva de crecimiento y expresión de las proteínas híbridas en la cepa vacuna y determinar las condiciones óptimas de expresión de los antígenos.

4.1.- Cultivar la cepa vacuna hasta la densidad óptica elegida en condiciones óptimas y preparar inóculos que contengan aproximadamente 10^7 bacterias en un volumen de aproximadamente 200 μ l.

- 4.2.- Inocular por vía oral ratones a los que previamente se les tomó muestras de sangre (suero preinmune), con la cepa vacuna que exprese alguna de las construcciones híbridas.
- 4.3.- Desafiar a los ratones inmunizados inoculándoles por vía oral una dosis del patógeno *H. pylori* P76.
- 4.4.- Tomar muestras de sangre de los ratones inmunizados para medir el título de anticuerpos contra las construcciones mediante ELISA.
- 4.5.- Sacrificar los animales, realizar cultivo primario de esplenocitos para ensayos de determinación de producción de citoquinas y al mismo tiempo evaluar la colonización de *H. pylori* en el estómago, comparada a aquélla en animales control.

El logro de estos objetivos constituirá el primer paso en el desarrollo de un prototipo de vacuna contra *H. pylori*, el que deberá ser aprobado y ratificado a través de los ensayos de Fase I, II y III requeridos para la aprobación de toda vacuna o fármaco que pueda ser utilizado en el hombre con fines profilácticos o terapéuticos, para el control de una enfermedad como la causada por este patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizó ratones hembras BALB/c libres de patógenos, obtenidos del Instituto de Salud Pública. Se mantuvo a los ratones en jaulas con no más de 6 individuos en cada una, con agua y comida *ad libitum*, excepto los días en que se vacunó, en los que se les retiró la comida 6 horas antes de la inoculación. Antes de comenzar el protocolo se dejó a los animales en cuarentena durante una semana.

2. Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *E. coli* DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (Φ 80*LacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* (*Nal*^R) *thi-1* *relA1*
- *E. coli* JM109(DE3): *F* *traD36* *proAB* *lacI*^f *Z* Δ M15 (DE3) *gyrA96* (*Nal*^R)
- *E. coli* AD494(DE3): Δ *ara* *leu7967* Δ *lacX74* Δ *phoAPvull* *phoR* Δ *malF3* *F'*[*lac*⁺(*lacI*^f)*pro*] *trxB::kan* (DE3) *pLysS*
- *E. coli* χ 6212: ϕ 80*d* *lacZ* Δ M15 *deoR* Δ (*lacZYA-argF*)*U169* *supE44* λ *gyrA96* (*Nal*^R) *recA1* *relA1* *endA1* Δ *asdA4* Δ *zhf-2::Tn10* *hsdR17* (*R*⁻ *M*⁺)
- *E. coli* XL1 Blue: *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [*F'* *proAB* *lacI*^f *Z* Δ M15 *Tn10* (*Tet*^R)]

- *E. coli* TOP10: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80 Δ *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara,leu*) 7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* (*Str^R*) *endA1* *nupG*⁻
- *S. typhimurium* χ 3730: *leu* *hsdL* *galE* *trpD2* *rspL120* (*Str^R*) Δ *asdA1* Δ [*zhf-4::Tn10*] *metE551* *metA22* *hsdSA* *hdsB* *ilv*
- *S. typhimurium* χ 4550: *gyrA1816* (*Nal^R*) Δ *asdA1* Δ [*zhf-4::Tn10*] Δ *crp-1* Δ *cya-1*
- *Helicobacter pylori* P76: *cagPAI*⁻, *vacA*⁺ (Gómez-Duarte y cols, 1998)

3. Plásmidos

El vector lineal pGEMT easy se obtuvo de Promega y se utilizó para clonar productos de PCR generados por Taq DNA polimerasa. Los plásmidos pET27b y pET21d se obtuvieron de Novagen, y se mantuvieron en cepas de *E. coli* TOP10 o DH5 α para su propagación.

Se disponía previamente del fragmento codificante para el carboxilo terminal de VacA de *H. pylori* 60190 (denominado CT2), clonado en el vector pGEMT easy, flanqueado por el lado 5' por secuencias NcoI y EcoRV, y por el lado 3' por una secuencia BamHI (Martínez, 2006). También se disponía del gen *hpaA* de *H. pylori* 60190, fusionado al epitopo c-myc por el lado 5' y a CT2 VacA por el lado 3', ligado en el vector pET27b y transferido a la cepa *E. coli* JM109(DE3). El gen *cagA* de las cepas de *H. pylori* J99 y G27 se encontraba

previamente clonado en el vector pGEMT en *E. coli* DH5 α (Palacios, 2006). El gen *asd* de *E. coli* se encontraba previamente ligado en el vector pCRII, flanqueado por sitios BamHI y Scal (García de la Guarda, 1998).

4. Oligonucleótidos

Se diseñó los partidores para amplificar las regiones NT y A17C del gen *cagA* utilizando las secuencias publicadas, incorporando los sitios de clonamiento adecuados (tabla I). Se utilizó como temperatura de alineamiento 44°C.

Se disponía previamente de partidores para amplificar los genes o segmentos codificantes para CT2 de *VacA*, *HpaA* y *Asd* (Martínez, 2006), además de los partidores del sistema pET (tabla I).

5. Técnicas de biología molecular

Los plásmidos se purificaron mediante la técnica de la lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989) y los kits de extracción de DNA plasmidial Qiaprep (Qiagen) o E.Z.N.A. (Omega). Se extrajo bandas de geles de agarosa y se purificó productos de PCR mediante el kit de extracción Qiaquick (Qiagen) o E.Z.N.A. (Omega). Las digestiones con enzimas de restricción, ligaciones y desfosforilaciones se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente (Sambrook y cols., 1989). Se analizó la inserción de fragmentos en vectores de clonamiento mediante una extracción rápida de DNA plasmidial denominada "one step"

- *E. coli* TOP10: *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80 Δ *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara,leu*) 7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* (*Str^R*) *endA1* *nupG*⁻
- *S. typhimurium* χ 3730: *leu* *hsdL* *galE* *trpD2* *rspL120* (*Str^R*) Δ *asdA1* Δ [*zhf-4::Tn10*] *metE551* *metA22* *hsdSA* *hdsB* *ilv*
- *S. typhimurium* χ 4550: *gyrA1816* (*Nal^R*) Δ *asdA1* Δ [*zhf-4::Tn10*] Δ *crp-1* Δ *cya-1*
- *Helicobacter pylori* P76: *cagPAI*⁻, *vacA*⁺ (Gómez-Duarte y cols, 1998)

3. Plásmidos

El vector lineal pGEMT easy se obtuvo de Promega y se utilizó para clonar productos de PCR generados por Taq DNA polimerasa. Los plásmidos pET27b y pET21d se obtuvieron de Novagen, y se mantuvieron en cepas de *E. coli* TOP10 o DH5 α para su propagación.

Se disponía previamente del fragmento codificante para el carboxilo terminal de VacA de *H. pylori* 60190 (denominado CT2), clonado en el vector pGEMT easy, flanqueado por el lado 5' por secuencias NcoI y EcoRV, y por el lado 3' por una secuencia BamHI (Martínez, 2006). También se disponía del gen *hpaA* de *H. pylori* 60190, fusionado al epitopo c-myc por el lado 5' y a CT2 VacA por el lado 3', ligado en el vector pET27b y transferido a la cepa *E. coli* JM109(DE3). El gen *cagA* de las cepas de *H. pylori* J99 y G27 se encontraba

(Atrazhev, y Elliot, 1996), digestión con enzimas de restricción y amplificación de los fragmentos correspondientes mediante PCR.

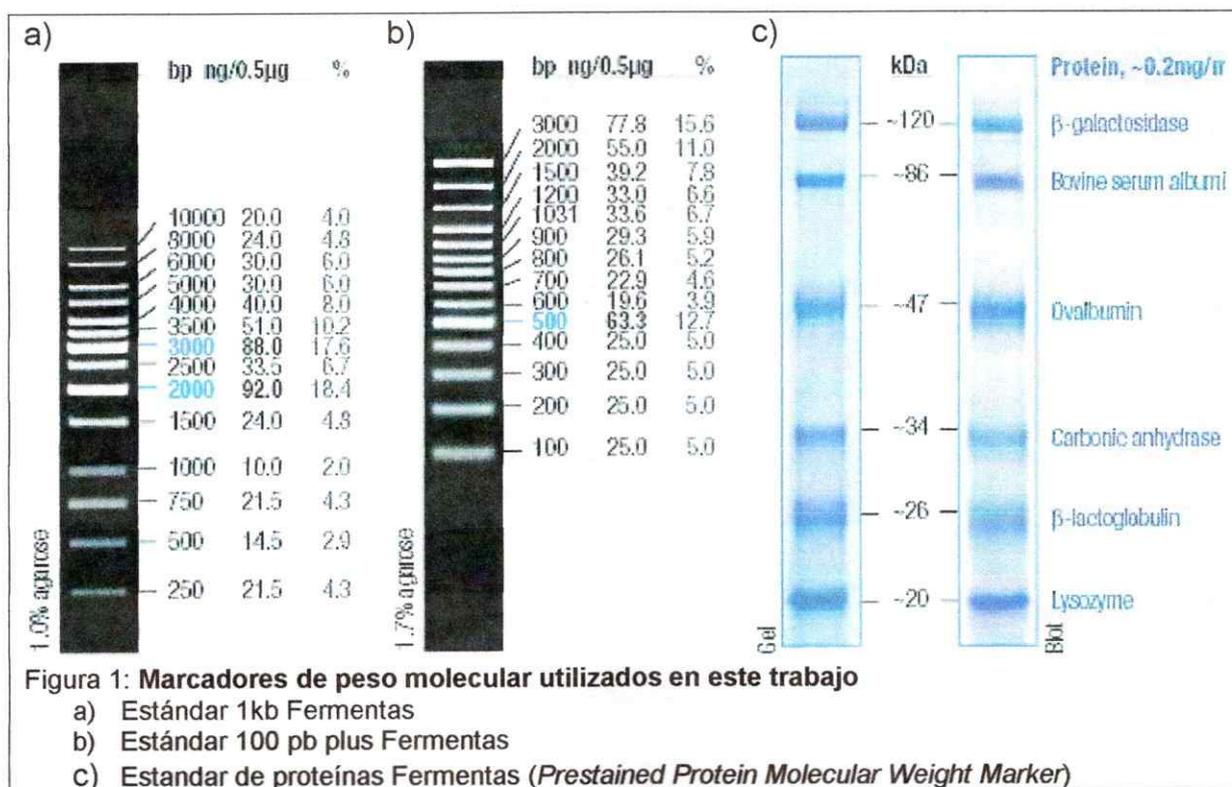
Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como partidores para la amplificación de las regiones utilizadas como antígeno.

Nombre	Antígeno	Secuencia adicional	Secuencia (5'→3')*
cagNT-1	NT	Corte <i>NcoI</i>	<u>CCATGG</u> GATACAGGTTCTTCCATAAAGAG
cagNT-2	NT	Corte <i>EcoRV</i>	GATATCAATGTCAGCGACTCCCTCAAC
cagNT-3	NT	Corte <i>BamHI</i> , codón STOP, cola de Histidina	<u>GGATCCT</u> AATGATGATGATGATGATGATC AATGTCAGCGACTCCCTCAAC
cgA17CT1	A17C	Corte <i>NcoI</i>	<u>CCATGGG</u> AAAAAATTCTGCACTATAC
cgA17CT2	A17C	Corte <i>EcoRV</i>	<u>GATATCG</u> TTAGTAGCGTAATTGTCC
cgA17CT3	A17CT	Corte <i>BamHI</i> , codón STOP, cola de Histidina	<u>GGATCCT</u> AATGATGATGATGATGATGGTT AGTAGCGTAATTGTCC
VCCT2	CT2 VacA	Corte <i>BamHI</i> , codón STOP	<u>AGCTGGATCCT</u> TAGAACTATACCTCATT CC
hpaA3f	HpaA	Corte <i>NcoI</i>	ATATT <u>CCATGG</u> CGGCCGCGTGCAGCCCG CATATTATTGAAGTC
asdEC-1	Asd	Cortes <i>ScaI</i> y <i>BamHI</i>	CTCTAGTACTGGATCCATAATCAGGATCA ATAAACTGC
asdEC-2	Asd	Cortes <i>ScaI</i> y <i>BamHI</i>	<u>AGCTAGTACTGGATCCT</u> GTATTACGCACT AACAGGGGCG
pET7D	Prom. T7	no	TAATACGACTCACTATAGGG
pET7R	Term. T7	no	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

* Se muestra subrayado los sitios de corte para enzimas de restricción y en negrita los codones stop.

6. Marcadores de peso molecular

Como marcador del peso molecular en corridas electroforéticas de DNA se utilizó los estándares Fermentas 100pb plus o 1kb (Fig. 1 a, b). Como marcador de peso molecular en corridas electroforéticas de proteína se utilizó el estándar *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fig 1 c) de Fermentas, que será denominado *Estándar de proteínas Fermentas* en las subsecuentes figuras.



7. Amplificación de los antígenos de *cagA*

Se utilizó como molde el gen *cagA* de las cepas J99 y G27, ligado a pGEMT, clonado en DH5α, extraído mediante una mini preparación de cepas ya existentes en el laboratorio (Palacios, 2006). Se desnaturó el DNA por 1 minuto a 94°C, para luego amplificar mediante 35 ciclos, consistentes en: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 44°C y 1 minuto a 72°C, seguidos de una elongación final de 10 minutos a 72°C; las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. Los fragmentos fueron purificados a partir de geles de agarosa 1% mediante kit comerciales.

8. Comprobación de la construcción de los híbridos por PCR

Para comprobar la presencia de los híbridos de los fragmentos de CagA o c-hpaA y CT-VacA se realizó PCR, utilizando como molde DNA plasmidial o un lisado total de una colonia con la correspondiente construcción plasmidial disuelta en 5 µl de agua. Como partidores se usó aquél que alinea en el 5' del fragmento clonado y el partidor VCCT2 (Tabla 1). El DNA se desnaturó a 94°C por 1 minuto, luego se amplificó con 30 o 35 ciclos, consistentes en: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 44°C y 2 minutos a 72°C, seguidos de una elongación final de 10 minutos a 72°C; las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su análisis.

9. Cultivo de cepas bacterianas

En general, las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium* ya transformadas se crecieron a 37°C con agitación, en caldo LB (peptona 1%; NaCl 0,5 %; extracto de levadura 0,5%) suplementado con el antibiótico requerido (Ácido nalidíxico 25 µg/ml, Tetraciclina 25 µg/ml, Kanamicina 50 µg/ml, Estreptomina 50 µg/ml o Cloramfenicol 35 µg/ml) más el requerimiento nutricional adecuado (Ácido diamino pimélico, 50 µg/ml), durante toda la noche (16h) para obtener cultivos saturados. Las cepas sin transformar se crecieron en condiciones similares, incluyendo aquéllos antibióticos cuyos genes de resistencia eran de origen cromosomal (Ácido nalidíxico, Estreptomina, Kanamicina).

Para aislar colonias de *S. typhimurium* se utilizó, además, placas de agar SS suplementadas adecuadamente. Las placas se incubaron a 37°C.

Para preparar las dosis de los prototipos de vacunas y construir curvas de crecimiento y expresión se reinoculó un cultivo saturado en una dilución 1:30 o 1:50 en medio fresco suplementado adecuadamente, dejándose crecer hasta una densidad óptica (600nm) adecuada para el experimento (generalmente $DO_{600} = 0,5$). Se tomó alícuotas a intervalos de tiempo definidos y se sembró diluciones seriadas en placas de agar LB (caldo LB más 1,5% agar) para determinar el número de unidades formadoras de colonias en cada tiempo y condición analizados.

La cepa de *H. pylori* P76 se creció a partir de cultivos conservados a -70°C en placas de agar Brucella suplementadas con 5% sangre de caballo y DENT (Vancomicina 10 µg/ml, Trimetoprima 5 µg/ml, Cefsulodina 5 µg/ml, Anfotericina B 5 µg/ml), en condiciones microaerofílicas (5% CO₂) a 37°C durante 2 días. Luego se re-sembró en placas del mismo medio, dejándolas crecer durante 1 día para preparar diluciones en PBS - NaHCO₃ (7,5%) 4:1, y estimar, mediante cultivo en placas de agar Brucella más 5% sangre de caballo, el número de unidades formadoras de colonias según la DO_{600} .

10. Almacenamiento de cepas bacterianas

Se guardó las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*, crecidas en caldo LB a saturación, en 50% glicerol a -20°C, o en 14% glicerol a -70°C. La cepa P76 de *H. pylori* se guardó, a partir de cultivos en placa, a -70°C en medio de almacenamiento (BHI 15%, Glicerol 14% en PBS).

11. Transformación bacteriana con DNA plasmidial

Para transformaciones con DNA plasmidial sobreenrollado se permeabilizó las células con cloruro de calcio, de acuerdo a lo descrito previamente (Sambrook y cols., 1989). En el caso de ligaciones de DNA a vectores plasmidiales se transformó mediante electroporación (Miller, 1994). Las células electrocompetentes se prepararon según el método descrito previamente (Miller, 1994).

12. Construcción de la cepa control *S. typhimurium* χ 4550 pGP1-2 pET27b *asd*

El vector pET27b se cortó en el sitio interno *Sma*I del gen de resistencia a kanamicina y se ligó con el gen *asd* de *E. coli* digerido previamente con *Sca*I. Con esta mezcla de ligación se transformó *E. coli* χ 6212 (Δ *asd*) y se seleccionó transformantes en placas de agar LB que contenían sólo ácido nalidíxico (25

µg/ml), sin DAP. Así, la selección positiva fue por complementación de la mutación *asd* de la hospedera con el gen silvestre incorporado en pET27b. Se comprobó que los transformantes habían perdido la resistencia a kanamicina creciéndolas en caldo LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml). Se seleccionaron dos clones transformantes sin resistencia a kanamicina y se les extrajo DNA plasmidial, al que se le realizó PCR para comprobar la presencia del gen *asd*. Luego se transformó con este plásmido directamente la cepa de *S. typhimurium* χ 4550 pGP1-2 y se seleccionó en placas de agar LB suplementadas sólo con kanamicina (50 µg/ml), por ser kanamicina el marcador de resistencia presente en pGP1-2, plásmido adicional requerido en *S. typhimurium* para la expresión dirigida por el promotor T7. Para comprobar la presencia del gen *asd* se realizó PCR con los partidores *asd*EC-1 y *asd*EC-2, en condiciones ya descritas (García de la Guarda, 1998).

13. Inducción de la expresión y detección de antígenos

Para comprobar la expresión de los antígenos clonados en las cepas de expresión (*E. coli* JM109(DE3), *E. coli* AD494(DE3) y *S. typhimurium* χ 4550 pGP1-2), las bacterias se crecieron en medio LB, durante toda la noche a 37°C y con agitación. Posteriormente, se dividió el cultivo en dos tubos (5ml cada uno) y se indujo uno de ellos con IPTG 1mM. En el caso de la cepa χ 4550 pGP1-2 también se dio un pulso de 30 minutos a 42°C, para inducir la expresión de la RNA polimerasa T7, codificada en el plásmido pGP1-2, bajo el control del represor *cI857* del fago lambda. Se indujo entre 1 y 4h a 37°C con agitación y se preparó

lisados totales de las muestras. Se analizó electroforéticamente los lisados totales concentrados 10 veces en geles de poliacrilamida 12% y se visualizó mediante Western blot (Tobwin y cols., 1979).

Para detectar las fusiones a CT2 se utilizó un anticuerpo policlonal anti - VacA (AK204), disponible previamente, a una dilución 1:3000 en PBS – leche 2% como primer anticuerpo (Martínez, 2006). Al revelar con AK204, en todos los casos se observa una banda de reacción cruzada alrededor de los 30kDa. En el caso de c-HpaA/CT2 se ha descrito un patrón de doblete al revelar utilizando como primer anticuerpo AK204 (Martínez, 2006). Para visualizar HpaA, o su fusión a CT2 VacA, en algunos experimentos se utilizó un anticuerpo monoclonal (MabHP30) disponible previamente (Martínez, 2006). Como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de conejo o ratón, según correspondiera, conjugado a peroxidasa de rábano.

Como control positivo en las reacciones con AK204 se utilizó un lisado total de un clon de *E. coli* JM109 (DE3) que expresa una fusión disponible previamente entre una proteína de función hipotética (con dominio DsbG) y CT2 (HP0/CT2) clonada en pET27b. Como control positivo en las reacciones con MabHP30 se utilizó un clon de *E. coli* JM109(DE3) que expresa cHpaA/CT2 en pET27b. Como control negativo se utilizó la cepa JM109 (DE3) transformada sólo con el plásmido pET27b, o bien la cepa χ 4550 pGP1-2 pET27b asd.

14. Digestiones de células bacterianas intactas con tripsina

A partir de cultivos saturados de las cepas vacuna χ 4550 con las construcciones híbridas (ligadas en pET27b asd) c-HpaA/CT2 y NT/CT2 y dos controles híbridos, HP0231/CT2 y c-HpaA/CT2 ligados a pET27b y expresados en *E. coli* JM109(DE3) se reinocularon 10 ml de medio LB suplementado con kanamicina 50 μ g/ml en una dilución 1:50. Los cultivos se crecieron con agitación a 37°C hasta una DO_{600} entre 0,4 y 0,6 y luego se indujeron durante 1 h con 1 mM de IPTG a 42°C, para las cepas vacuna, o a 37°C, para los controles. Las bacterias se centrifugaron por 15 minutos a 4000 rpm y se lavaron cuidadosamente con PBS antes de centrifugar nuevamente. Las bacterias se resuspendieron en 6,5 ml de mezcla de reacción (tripsina 2mg/ml, $MgCl_2$ 10mM, en PBS) y se incubaron a 37°C. Se tomó muestras a distintos tiempos, deteniendo la reacción con PMSF 1mM. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 11.000 rpm, y el sobrenadante fue descartado. Los sedimentos fueron guardados a -20°C hasta su análisis mediante Western blot de lisados totales. La concentración relativa de cada constructo, a un tiempo dado, se estimó en el programa ImageJ (Abramoff y cols., 2004). Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Eppendorf 5415D con rotor de ángulo fijo.

15. Preparación y formulación de las dosis para vacunar ratones

A partir de cultivos saturados de la cepa vacuna y el control, se reinocularon 50 ml de medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml con una dilución 1:50. Los cultivos se crecieron con agitación a 37°C hasta una DO_{600} de 0,5. Se indujo la expresión de los antígenos con IPTG 1mM durante 1h a 42°C con agitación y se midió la DO_{600} para determinar el número de bacterias viables con la ayuda de una curva de calibración construida previamente. Se tomó la cantidad adecuada del cultivo para obtener una cantidad de $1,5 \times 10^8$ bacterias (15 dosis) y se centrifugó a 10.000rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 3ml de PBS – $NaHCO_3$ (7,5%) en proporción 4:1. Cada dosis fue de 1×10^7 UFC en 200µl y fue administrada a los ratones vía oral utilizando una sonda oroesofágica de teflón (Bránula Insyte), luego de anestésiar los animales con éter por inhalación.

Para desafiar los ratones se creció *Helicobacter pylori* P76 en placas de agar Brucella suplementado con 5% de sangre de caballo y DENT (Vancomicina 10 µg/ml, Trimetoprima 5 µg/ml, Cefsulodina 5 µg/ml, Anfotericina B 5 µg/ml), durante un día en condiciones microaerofílicas (5% CO_2) a 37°C. Las bacterias se obtuvieron mediante raspado de las placas y dilución en PBS - $NaHCO_3$ (7,5%) 4:1. Se estimó el número de bacterias viables y se prepararon inóculos (1×10^7 UFC) para el desafío como se describió para las inmunizaciones. El desafío fue realizado vía oral con sonda oroesofágica (Bránula Insyte).

16. Detección de antígenos luego de remover inductor

A partir de cultivos saturados de la cepa vacuna se reinoculó 50 ml de medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml con una dilución 1:50. Los inóculos se crecieron con agitación a 37°C hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0,5 y se indujo la expresión de los antígenos con IPTG 1mM durante 1h a 42°C, con agitación. Luego se centrifugó las bacterias a 4000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con PBS. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 50 ml de medio LB sin suplementar y las bacterias se dejaron a 42°C con agitación. Cada 24 h se midió DO₆₀₀ de los cultivos y se tomó una muestra. Luego se renovó el medio de los cultivos, centrifugándolos a 4000 rpm durante 15 minutos y resuspendiendo el sedimento en 50 ml de medio LB sin suplementar. Se prepararon lisados totales de las muestras recolectadas, ajustados según DO₆₀₀ y concentrados 20 veces, y se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12%. Los antígenos se detectaron mediante Western blot, utilizando como primer anticuerpo AK204 diluido 1:1000.

17. Vacunación de ratones, desafío y toma de muestras

Se trabajó con ratones BALB/c de 8 semanas de edad, divididos en tres grupos con 13 (controles) o 14 (vacuna) animales cada uno. El primer grupo se inoculó con la cepa vacuna que expresa cmyc HpaA/CT2 (grupo vacuna), el

segundo grupo se inoculó con la cepa vacuna que sólo contiene el plásmido de expresión (grupo control pET) y el tercer grupo fue el control, inoculado sólo con el vehículo PBS – NaHCO₃ (7,5%) 4:1 (grupo control PBS). Desfasado temporalmente, se dispuso un cuarto grupo de 3 ratones, que fue tratado con la vacuna, y al cual se le realizó un tratamiento idéntico a los tres grupos principales. Los datos de este grupo se agregaron a los del grupo vacuna, previa comprobación de su similaridad estadística. Se tomó muestras de sangre preinmune en el día 0 del experimento (muestras denominadas PI). Los días 2, 5 y 7 los ratones fueron inoculados vía oral con una dosis de 200µl que contiene 1x10⁷ bacterias en PBS – NaHCO₃ (7,5%) 4:1. A la quinta semana se tomó una muestra de sangre, denominada M1, y se dio una inoculación oral de refuerzo, consistente en una dosis de 1x10⁷ bacterias o el vehículo de inmunización para el grupo control. Cuatro semanas después (semana 9) se tomó una nueva muestra de sangre, que se denominó M2. A la décimo primera semana todos los grupos fueron desafiados con 1x10⁷ CFU de *H. pylori* P76. A las 3 semanas luego del desafío (semana 14) se tomó una última muestra de sangre (denominada D) y los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

18. Procesamiento de muestras

18.1 Sangre

Las muestras de sangre se mantuvieron a 37°C por 10 minutos, seguido de 4°C durante 16h para lograr la separación del suero. Luego se centrifugó a 1500

rpm durante 30min y se extrajo la fracción del sobrenadante, correspondiente al suero. El suero se guardó congelado a -70°C hasta su utilización para determinación de anticuerpos mediante ELISA.

18.2 Órganos

De los ratones se extrajo el bazo y el estómago en condiciones estériles. El estómago se cortó longitudinalmente por la curvatura menor y se lavó con PBS, para luego dividirlo longitudinalmente en tres. Un tercio se mantuvo en formaldehído 10% a 4°C para su análisis histológico, otro se homogenizó en suero fisiológico estéril para análisis de citoquinas y el último tercio se pesó y homogenizó en medio de almacenamiento para preparar diluciones seriadas y determinar el número de unidades formadoras de colonias remanentes en el estómago mediante cultivo en placa.

18.3 Cultivo de esplenocitos

El bazo se disgregó sobre una malla de disgregación con 1 ml de medio RPMI 1640 sin suplemento y se lavó la malla con 4 ml de medio RPMI sin suplemento. El producto recolectado se llevó a un volumen final de 12 ml con RPMI y se centrifugó por 8 minutos a 1500 rpm. El pellet se disolvió y trató con 3 ml de buffer de lisis de eritrocitos ($0,17\text{ M NH}_4\text{Cl}$ en $10\text{ mM Tris-HCl pH }7,5$) por 5 minutos. Se extrajo con la pipeta el tejido aglomerado, se llevó a un volumen final de 12 ml con medio RPMI y se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm. El pellet se resuspendió cuidadosamente en 1 ml de medio RPMI suplementado con

glutamina, 10% SFB y 25 mM HEPES. Se determinó el número de células por el método de exclusión de Azul Tripán en cámara Neubauer. Se sembraron 2×10^6 esplenocitos por pocillo, en placas de 24 pocillos y se incubaron con Concanavalina A, HpaA purificada o PBS por 24 h. Luego se tomó el contenido del pocillo y se centrifugó 8 minutos a 1500 rpm para obtener el sobrenadante, que se guardó a -70°C hasta su uso para la determinación de citoquinas.

19. Purificación de antígenos para ELISA

La cepa de *E. coli* AD494 (DE3) pLysS con la construcción previamente disponible pET21d hpaA His6 se transformó por permeabilización con cloruro de calcio (Sambrock y cols., 1989) y se seleccionó en placas de agar LB con cloramfenicol (35 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), que corresponden a los marcadores plasmidiales de pLysS y pET21d, respectivamente. Se aislaron varias colonias y se crecieron a saturación durante la noche en medio LB, suplementadas con cloramfenicol y ampicilina. Los cultivos se reinocularon en medio fresco con una dilución 1:50 y se crecieron hasta una DO_{600} de aproximadamente 0,5 para inducir con IPTG 1mM durante 2 h. Se comparó todos los clones por análisis en geles de poliacrilamida utilizando un lisado total de cada uno de ellos y se eligió aquél que tuviera una mayor expresión juzgando por tinción con azul de Coomassie.

Para purificar el antígeno HpaA His6 se reinoculó matraces con 500 ml de medio LB suplementado con cloramfenicol (35 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), en dilución 1:50 a partir de un cultivo saturado. El cultivo se creció hasta $\text{DO}_{600} = 0,5$ y se agregó IPTG 1mM. Se indujo durante 2 a 3 h y se centrifugó a 4500 rpm durante 30 minutos. El sedimento se guardó a -20°C durante la noche y se resuspendió en buffer B (urea 8 M; NaH_2PO_4 0,1M; Tris-HCl 0,01M, pH 8,0) suplementado con PMSF 1mM. El antígeno se purificó mediante una columna de afinidad Ni-NTA (Novagen) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el antígeno se dializó durante toda la noche o durante 6 horas con cambio de tampón cada hora, en tampón de diálisis (Tris 10mM, Triton X-100 0,1%, pH 8,0), para eliminar la urea y se concentró dejando las bolsas de diálisis en contacto con PEG 8000 sólido a temperatura ambiente hasta que el volumen se redujo a la mitad. Posteriormente, la solución se volvió a concentrar en un filtro de centrifuga (Amicon Ultra 4). Se determinó la concentración mediante una curva de calibración de BSA, en gel de poliácridamida, y se diluyó el antígeno en buffer NaHCO_3 0,1M pH=8,4 hasta 5 $\mu\text{g/ml}$.

20. Determinación del título de anticuerpos en suero

El título de anticuerpos se determinó mediante ELISA. Cada lavado mencionado a continuación consiste en la adición de 400 μl PBS - Tween 20 0,02%, agitación lateral y eliminación del líquido, y se realizó en un lavador de ELISA automático Asys Atlantis 4. Se hizo una calibración preliminar utilizando

sueros escogidos al azar, para determinar el rango de sensibilidad y la concentración de suero a utilizar, mediante un ensayo similar al descrito más adelante, pero en el que los sueros se agregaron en diluciones seriadas desde 1/16 a 1/2048. Se escogió la dilución 1/256 para los ensayos. Los ensayos se realizaron en placas para ELISA de 96 pocillos, las que se activaron con 100 μ l conteniendo 500 ng de antígeno (HpaA His6 purificado) por pocillo, incubando durante 16 horas a 4°C con agitación rotatoria constante. Luego, se eliminó el líquido y la placa se lavó 3 veces. Se bloqueó con 200 μ l de PBS – BSA 1% por pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Las placas se lavaron 3 veces como antes, previo a agregar la dilución de suero.

Los sueros se agregaron a cada pocillo a una dilución de 1/256, con un volumen final de 100 μ l. Se utilizó como tampón de dilución PBS – BSA 1%. Las placas se incubaron durante 2 h a 37°C y luego se lavaron 3 veces. Posteriormente se agregaron 50 μ l de una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario, anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, en PBS – BSA 1%. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces previo a revelar.

El revelado se efectuó con una solución reactiva compuesta por una solución de TMB (1mg/ml en DMSO) diluida 1:10 en tampón citrato 35mM y fosfato 67mM pH 5,0 y H₂O₂ 30% v/v a una dilución 1:1000. Se agregaron 50 μ l de esta mezcla por pocillo y se detuvo la reacción luego de 10 min a temperatura

ambiente (aproximadamente 25°C), adicionando 100µl de H₂SO₄ 4N por pocillo. Los resultados se determinaron mediante lectura de absorbancia a 450nm. Como calibración se utilizó el anticuerpo monoclonal anti HpaA MabHP30 (Martínez, 2006), en dilución seriada a partir de 1/25 a 1/3200. Para efectos de simplicidad, se estableció el primer punto como 100 unidades arbitrarias. La curva obtenida a partir del estándar se aproximó mediante una ecuación logarítmica, que se utilizó para determinar el título de las muestras. A los valores se les restó el valor preinmune para el análisis estadístico mediante el test de comparación múltiple de Dunn.

21. Determinación de citoquinas a partir de estómagos de ratones

Un tercio de estómago de ratones inmunizados con la cepa vacuna y los controles fue disgregado con un homogenizador eléctrico (OMNI Th Internacional) en 1 ml de suero fisiológico (NaCl 0,9%). Se centrifugó a 12.000 g por 5 min para obtener el sobrenadante. El contenido proteico total fue determinado en una dilución 1:10 de los homogenizados de estómago mediante el método del ácido bicincónico (Pierce, Rockford, IL) y el contenido total de proteínas fue expresado como mg/ml. El rango de detección del ensayo fue desde 20 hasta 2000 ug/ml.

Los niveles de IL-12, IL-10, IFN-γ, IL-4, TNF-α y TGF-β fueron determinados tanto en los sobrenadantes de estómago como en los

sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos mediante ELISA (BioSource Internacional, CA). Los ensayos no poseen reactividad cruzada con otras citoquinas y los límites de detección son 2 pg/ml para IL-12, 13 pg/ml para IL-10, 1 pg/ml para IFN- γ , 5 pg/ml para IL-4, 3pg/ml para TNF- α y 15,6 pg/ml para TGF- β . La concentración final de citoquina fue expresada como pg/ml para los sobrenadantes de cultivo y en pg/mg total de proteínas para los sobrenadantes del homogenizado de estómago.

22. Secuenciación y Bioinformática

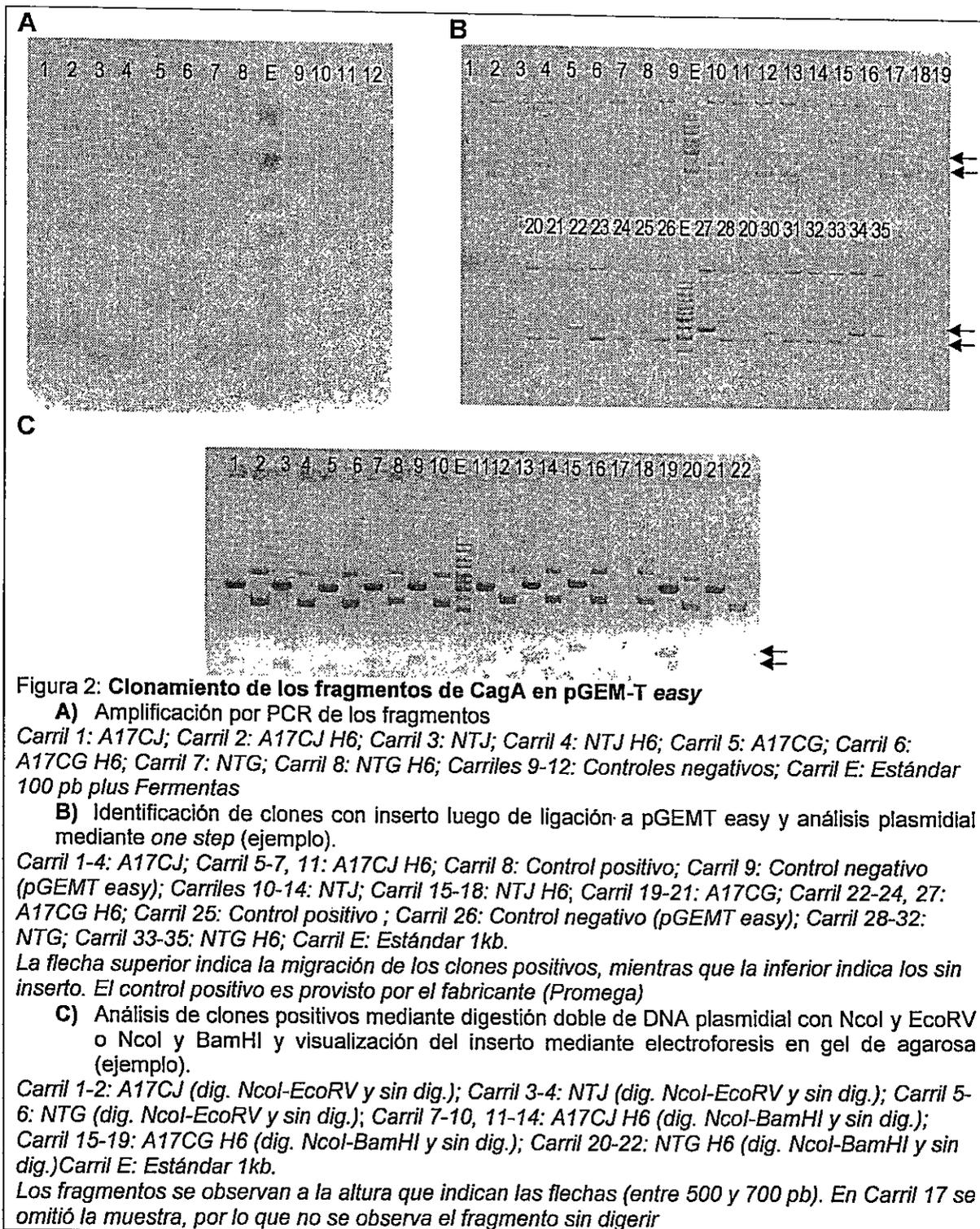
Cuando fue necesario, se envió a secuenciar muestras, mediante una variación de la técnica de Sanger, al servicio de Secuenciación Automática de la P. Universidad Católica. Las secuencias fueron comparadas entre sí o con las publicadas en la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mediante el programa computacional ClustalW, del *European Bioinformatic Institute* (EBI), disponible al público en su sitio web. La determinación de sitios de restricción, la traducción de las secuencias obtenidas y parte del diseño y análisis de partidores se realizó utilizando el programa computacional Vector NTI 8 de *InforMax Inc.*

RESULTADOS

1. Amplificación y clonamiento de los fragmentos NT y A17C del gen CagA

Se amplificó mediante PCR con DNA polimerasa Taq los fragmentos NT y A17C del gen CagA de las cepas de *H. pylori* G27 y J99, con y sin colas de histidina. Como molde se utilizó el gen CagA de cada cepa clonado en pGEM-T, el cual estaba disponible previamente. Se obtuvieron ambos fragmentos de tamaño aproximado al esperado, a juzgar por la migración electroforética en geles de agarosa: 570 pb para NT y 650 pb, para A17C, al utilizar el molde de J99. El fragmento A17C de G27 dio un tamaño mayor al de J99, de aproximadamente 760 pb, mientras que el fragmento NT presentó una migración similar, independiente de la cepa utilizada como molde. Se purificó la banda correspondiente a cada fragmento a partir de geles de agarosa mediante un kit comercial de extracción. Los fragmentos se ligaron a pGEM-T easy y se incorporaron en *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Los clones con inserto se seleccionaron mediante resistencia a ampicilina (100 μ g/ml) y ausencia de color azul para colonias crecidas en placas de agar LB suplementadas con ampicilina, IPTG (1 mM) y X-gal (40 μ g/ml). Las colonias blancas se crecieron en 1 ml de caldo LB durante toda la noche para analizar su contenido plasmidial al día siguiente mediante la técnica de "one step". Se seleccionaron tres clones positivos de cada fragmento para analizar mediante digestión doble del DNA plasmidial, con el fin de liberar el

inserto clonado. Se encontró al menos un clon positivo para cada una de las construcciones (Fig. 2).



2. Construcción de fusiones entre fragmentos de CagA y CT-VacA en *E. coli*

Se extrajo DNA plasmidial de los clones que presentan los fragmentos NT y A17C de ambas cepas (J99 y G27) en pGEM-T Easy, para digerirlos con NcoI y EcoRV. Los fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa y se intentó ligar simultáneamente a CT2 digerido con EcoRV y BamHI y al vector plasmidial pET27b digerido con NcoI y BamHI. Con estas ligaciones se transformaron por electroporación las cepas de *E. coli* DH5 α y XL1 Blue, pero no se obtuvo resultados positivos, por lo que se cambió la estrategia de ligación.

La construcción del híbrido CagA/CT2 se hizo en etapas. Inicialmente se ligaron los fragmentos de CagA, NT y A17C, separadamente con CT2 (digeridos con NcoI y EcoRV, y EcoRV y BamHI, respectivamente) en proporción 1:1, durante toda la noche. Esta reacción se utilizó como molde para PCR, utilizando los partidores cgA17C1 o cagNT-1 y VCCT2, de modo de amplificar la fusión del fragmento de CagA y CT2 y así evitar una etapa de subclonamiento. El amplicón correspondiente se purificó a partir de las bandas cortadas de un gel de agarosa y el DNA se extrajo mediante un kit comercial (EZNA, Omega Biotech). El amplicón purificado se ligó a pGEMT Easy, para luego transformar en XL1 Blue. Las colonias resultantes se crecieron en caldo LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) y su contenido plasmidial se analizó mediante "one step" y digestión enzimática (Fig. 3).

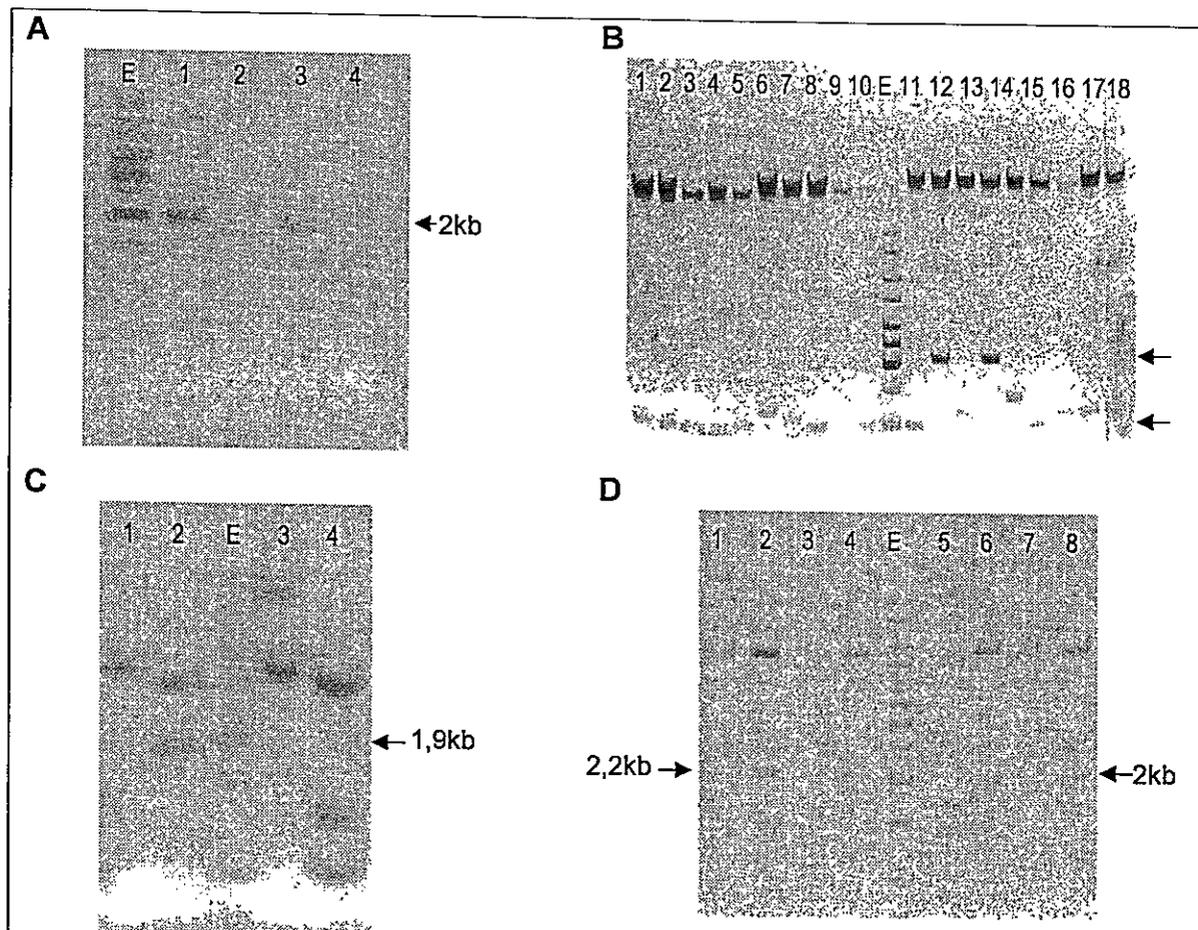


Figura 3: Construcción de los híbridos de fragmentos A17C y NT de CagA y CT2

- A)** Amplificación de los híbridos a partir de una ligación de A17C o NT con CT2 de VacA
 Carril 1: A17C J99/CT2; Carril 2: NT J99/CT2; Carril 3: NT G27/CT2; Carril 4: control negativo (sin DNA)
- B)** Detección de plásmidos mediante *one step* para identificar clones positivos. Se muestra, a modo de ejemplo, el gel analizado para NTJ/CT2
 Carriles 1-9 y 11-19: clones NTJ/CT2; Carril 10: control negativo (pGEMT easy)
- C)** Análisis de clones pGEM-T easy NTG/CT2 mediante digestión con NcoI y BamHI. La flecha indica la migración esperada (aproximadamente 1,9 kb).
 Carriles 1-4: dos clones cargados alternativamente sin digerir y digerido
 Sólo se observa liberación de un fragmento de tamaño esperado en el carril 2
- D)** Análisis de clones pGEM-T easy A17C/CT2 mediante digestión con NcoI y BamHI
 Carril 1-4: dos clones de A17CG/CT2 cargados alternativamente sin digerir y digerido
 Carril 5-8: dos clones de A17CJ/CT2 cargados alternativamente sin digerir y digerido
 Se observa liberación de un fragmento de tamaño esperado en todos los casos
- Carriles E: Estándar 1kb. Las flechas en A, C y D indican la banda de tamaño esperado en cada caso. En B, la flecha superior indica la migración de plásmido con inserto, mientras que la inferior sin él. Se observan dos clones positivos (carriles 12 y 14)

Luego de comprobada la presencia de cada constructo en pGEM-T easy, se eligió un clon positivo al azar, de los cuales se extrajo DNA plasmidial para posteriormente liberar el fragmento clonado mediante digestión con NcoI y BamHI y luego ligar el fragmento liberado en el vector de expresión pET27b digerido adecuadamente. Con las ligaciones se transformó XL1 Blue y se seleccionó colonias en placas de agar LB suplementado con kanamicina (50µg/ml). Las colonias resultantes de las transformaciones se crecieron en caldo LB para analizarlas mediante *one step*, digestión enzimática del DNA plasmidial, y PCR (Fig. 4).

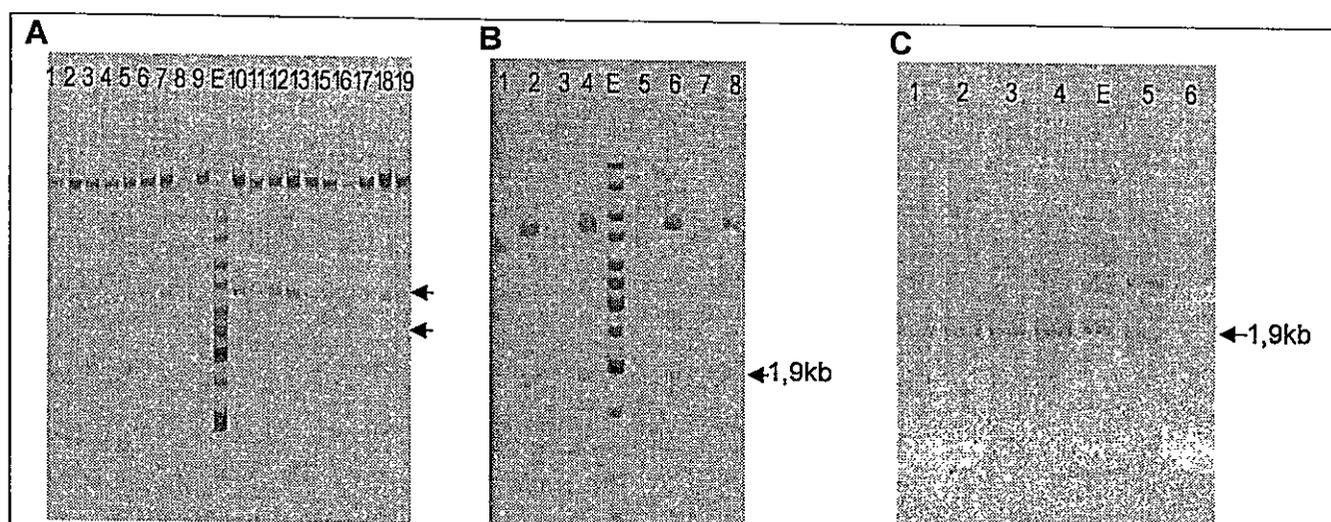


Figura 4: Comprobación de la presencia de los constructos híbridos en pET27b.

A) Detección de DNA plasmidial de los constructos híbridos NTJ/CT2 clonados en pET27b mediante *one step* (ejemplo).

Carriles 1-8, 10-19: Clones NTJ/CT2; Carril 9: Control negativo (pET27b)

B) Análisis de clones XL1 Blue pET27b NTJ/CT2 para detección del inserto mediante digestión con NcoI y BamHI.

Carriles 1-8: clones NTJ/CT2, cargados alternativamente sin digerir y digerido, en carriles seguidos

C) Identificación de los insertos del híbrido NTG/CT2 mediante amplificación por PCR

Carril 1-4: Clones NTG/CT2; Carril 5: control positivo PCR; Carril 6: control negativo (sin DNA)

Carriles E: Estándar 1kb. En A, la flecha superior indica migración del vector con inserto, mientras que la inferior, la del vector sin él. En B y C la flecha muestra la migración y el tamaño de la banda esperada

3. Expresión de los híbridos en *E. coli* JM109(DE3)

Antes de proseguir con el siguiente objetivo se transformó el DNA plasmidial de todos los constructos en la cepa de *E. coli* JM109(DE3) para comprobar su expresión mediante Western blot. Se seleccionó transformantes en placas de agar LB suplementadas con kanamicina (50 µg/ml) y los clones se crecieron toda la noche antes de inducir con IPTG. Se encontró expresión al transformar con los constructos NT de ambas cepas fusionados a CT2 (Fig. 5 A, B), pero no fue posible detectar expresión estable de los constructos A17C/CT2 (Fig. 5C). Se repitió esta última transformación varias veces, y se varió las condiciones de inducción, pero se encontraron problemas en todas ellas. Ocasionalmente se obtuvo productos de un peso molecular menor al esperado, pero la expresión de éstos no resultó reproducible, sugiriendo un producto tóxico. Se analizó digestiones enzimáticas del DNA plasmidial de estos clones y se encontró patrones anómalos (no mostrados), por lo que estos clones fueron descartados (Fig. 5 C). La secuenciación parcial de clones que presentan los constructos A17C/CT2, de ambas cepas, ligados a pET27b y contenidos en la cepa XL1-Blue no reveló ningún posible problema de alteración en la traducción, pues no se encontraron codones stop tempranos ni codones de bajo uso en *E. coli*, que pudieran detener o reducir la traducción del híbrido (Anexo 1). Con el fin de enfocar el trabajo y avanzar más rápidamente, los estudios con estos constructos fueron pospuestos, y los experimentos posteriores se realizaron sólo con los constructos NT/CT2.

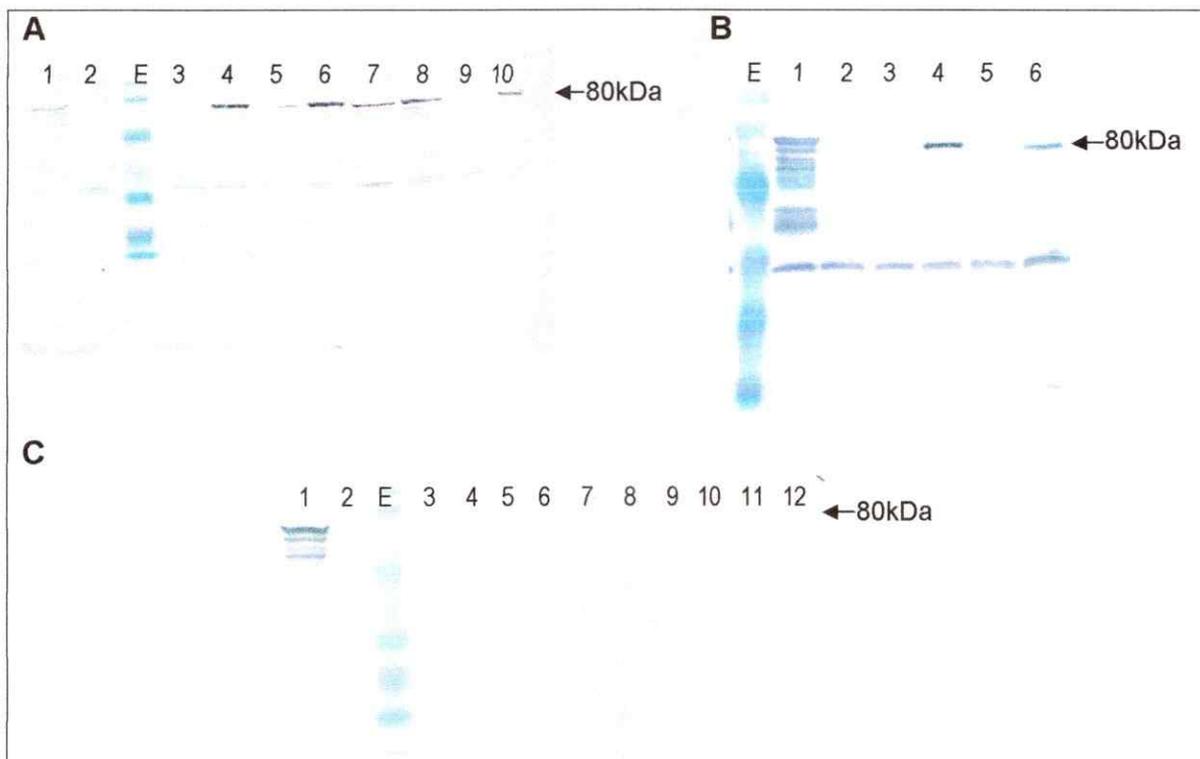


Figura 5: Expresión de los híbridos en JM109 (DE3)

A) Detección de la proteína NTG/CT2 expresada en pET27b.

Carril 1: control positivo; Carril 2: control negativo; Carril 3-10: clones NTG/CT2, cargados alternativamente sin inducir – inducido

B) Expresión de la proteína NTJ/CT2.

Carril 1: control positivo; Carril 2: control negativo; Carril 3-6: dos clones NTJ/CT2, cargados alternativamente sin inducir – inducido

C) Expresión aparente de la proteína A17CG/CT2

Carril 1: control positivo; Carril 2: control negativo; Carril 3-12: cinco clones A17CG/CT2, cargados alternativamente sin inducir – inducido. Se observan dos bandas (carriles 4 y 8) de expresión aparente, que no fueron observadas en experimentos subsecuentes

Carriles E: Estándar de proteínas Fermentas. Control positivo: HP0/CT2 expresado en pET27b en JM109(DE3). Control negativo: pET27b transformado a JM109(DE3).

La flecha muestra la migración esperada para cada constructo.

4. Inserción del marcador *asd* en los vectores plasmidiales en las construcciones híbridas

Para reemplazar el gen *nptII* (que codifica para neomicina fosfotransferasa), que confiere resistencia a kanamicina presente en el plásmido pET27b, se insertó

en un sitio interno de este gen el marcador genético *asd* de *E. coli*, que codifica para aspartato semialdehído deshidrogenasa, una enzima clave en la síntesis de la pared bacteriana. La razón para realizar el reemplazo del marcador de selección de pET27b es evitar la presencia de un gen de resistencia a antibiótico en la cepa vacuna. Con la incorporación del gen *asd* se establece una complementación metabólica en el vector pET27b, puesto que la cepa vacuna a utilizar, *Salmonella typhimurium* χ 4550, es mutante en el gen *asd*. De este modo, la permanencia del plásmido en la cepa vacuna se hace necesaria para permitir la síntesis del péptido glicán de la pared bacteriana. Con este fin se digirió el DNA plasmidial de los constructos híbridos con la enzima *Sma*I o *Nru*I, de corte romo, y que poseen un sitio en el gen *nptII*.

4.1 Inserción del gen *asd* en pET27b c-hpaA/CT2

Se disponía de una cepa de *E. coli* JM109(DE3) transformada con pET27b c-hpaA/CT2, cuya expresión fue comprobada por tinción con azul de Coomassie en geles de poliacrilamida y Western blot (Martínez, 2006). Esta cepa se usó para extraer el DNA plasmidial con el que se prosiguió esta parte del trabajo.

Puesto que el gen *hpaA* contiene un sitio *Sma*I, fue necesario realizar digestiones parciales de un minuto, que fueron separadas electroforéticamente, para luego cortar la banda correspondiente al plásmido linealizado y purificarla mediante un kit comercial. Intentos de ligar el vector linealizado al gen *asd* no

dieron resultados positivos al transformar en la cepa *E. coli* χ 6212 (la cual es mutante para el gen *asd* y, por lo tanto, dependiente del suministro exógeno de DAP a menos que se complemente su auxotrofia con un plásmido *asd*⁺). Al resultar imposible encontrar transformantes para el constructo híbrido, se decidió utilizar la enzima *Nru*I, que también corta en el interior del gen *nptII*.

Luego de varios intentos de ligación con las nuevas digestiones y posterior electroporación, no fue posible obtener una transformación exitosa en la cepa *E. coli* χ 6212, por lo que se decidió seguir una nueva estrategia. Se transformó DNA plasmidial extraído de la cepa JM109(DE3) pET27b c-hpaA/CT2 en χ 4550 (mutante en el gen *asd*, al igual que la cepa χ 6212), y se creció colonias producto de esta transformación, a las cuales se les extrajo DNA plasmidial. Se comprobó la presencia del inserto mediante digestión con *Nco*I y *Bam*HI (Fig. 6 A). Luego, el DNA plasmidial se digirió con la enzima *Nru*I, se desfosforiló para evitar autoligación del vector y se purificó mediante un kit comercial, para finalmente ligarlo al gen *asd* ya digerido en sus bordes con *Sca*I, de corte romo. El producto de esta ligación se transformó directamente en *S. typhimurium* χ 4550 pGP1-2 y se comprobó la presencia del inserto c-hpaA/CT2 mediante PCR de colonias. Se obtuvo una colonia positiva y la expresión de c-hpaA/CT2 se determinó mediante Western blot (Fig. 6 B, C).

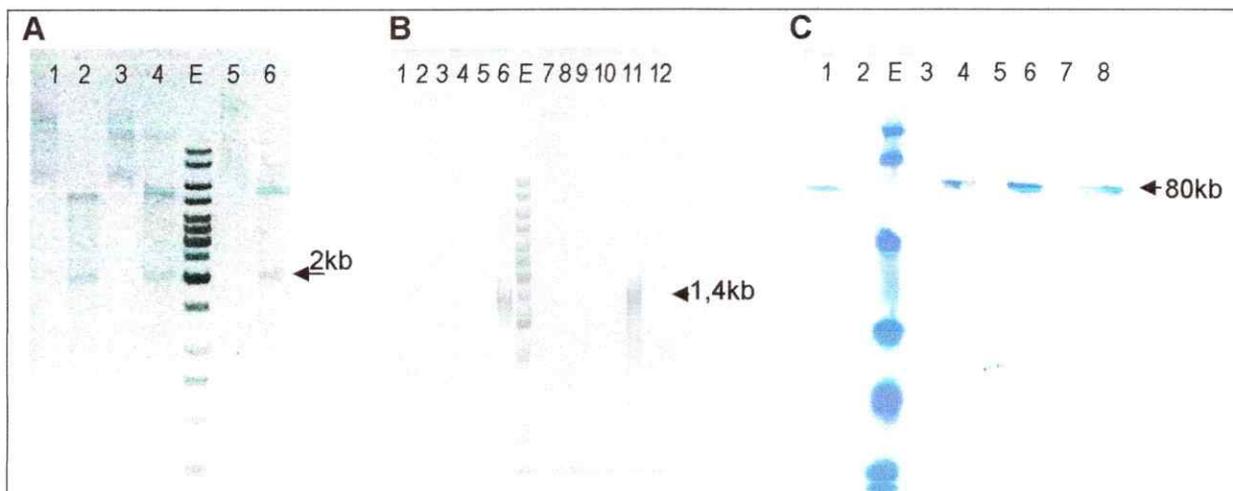


Figura 6: Construcción del plásmido pET27b c-hpaA/CT2 con el gen *asd* en lugar del gen *ntII*, e incorporación a *S. typhimurium* χ 4550 que contiene el plásmido pGP1-2

A) Comprobación de la presencia del inserto c-hpaA/CT2 en el vector pET27b mediante digestión con NcoI y BamHI, previo a linearización con NruI

Carriles 1-6: tres clones c-hpaA/CT2, cargados alternativamente sin digerir - digerido

B) Comprobación de la presencia del inserto *asd* mediante PCR. Sólo c14 dio reacción positiva.

Carriles 1-12: clones c-hpaA/CT2; Carril 6: control positivo, pCRII *asd*; Carril 11: clon 14, que presenta positividad

C) Comprobación de la expresión de c-hpaA/CT2 en *S. typhimurium*. Las condiciones de inducción se indican en *Materiales y Métodos*, punto 13.

Carril 1: control positivo JM109(DE3) pET27b c-hpaA/CT2; Carril 2: control negativo χ 4550 pGP1-2 pET27b *asd*; Carril 3-4: sin inducir e inducido por 1h; Carril 5-6: sin inducir e inducido por 2h; Carril 7-8: sin inducir e inducido por 3h

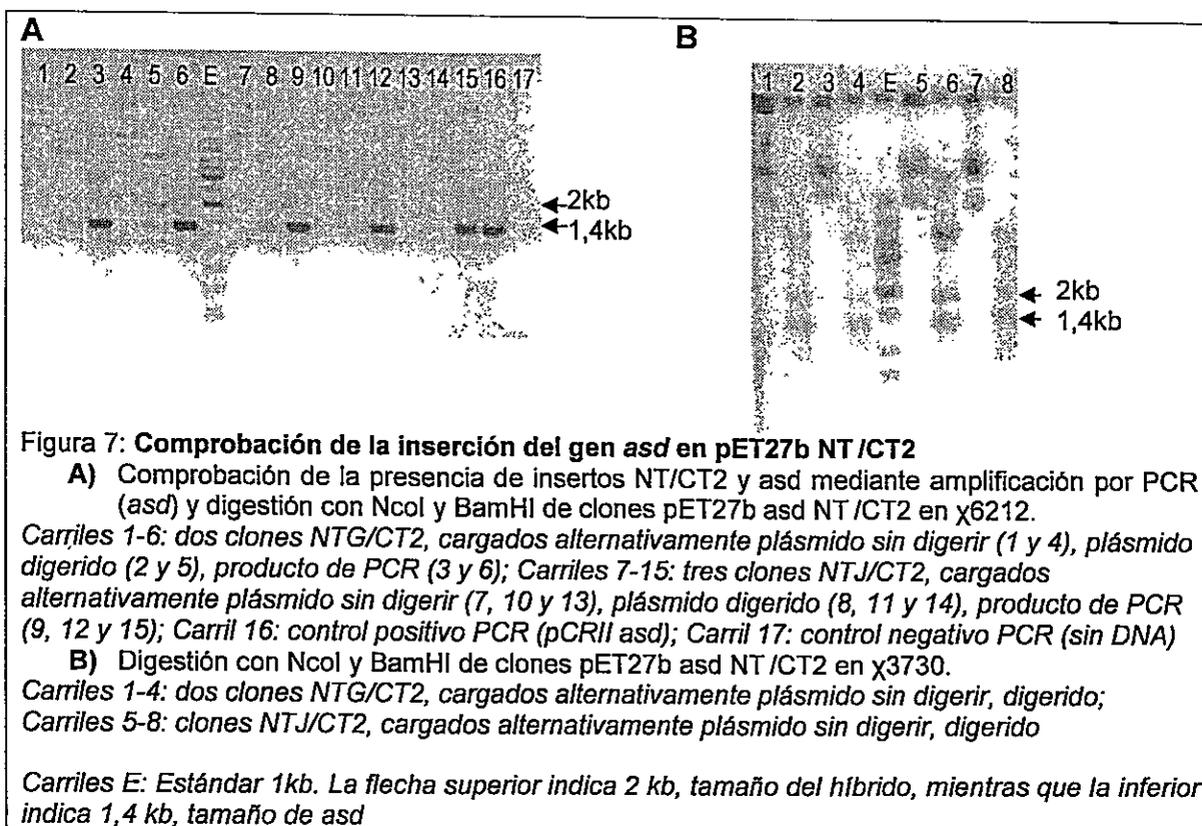
Carriles E: Estándar de proteínas Fermentas. Las flechas muestran la migración de la banda esperada en cada caso

4.2 Inserción del gen *asd* en pET27b NT/CT2

Se seleccionó un clon positivo para expresión de NT/CT2 (comprobado por expresión en JM109 (DE3)) entre los transformantes XL1Blue pET27b NTJ/CT2 y NTG/CT2 y se digirió su DNA plasmidial con SmaI, que corta en el gen de resistencia a kanamicina y no entre los segmentos NT/CT2. Los plásmidos linealizados se ligaron al gen *asd* digerido previamente con Scal. Los productos de ligación se transformaron en la cepa de *E. coli* χ 6212. Se seleccionó los

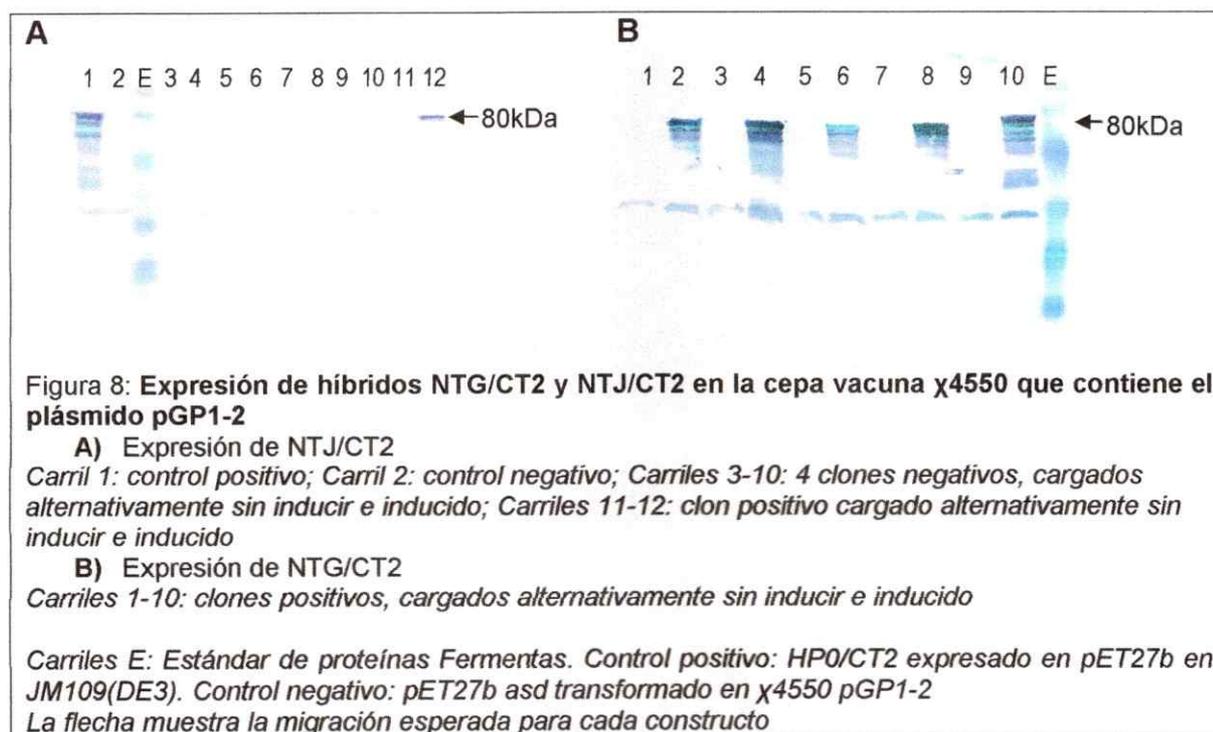
transformantes en placas de agar LB suplementadas con ácido nalidíxico (25µg/ml), sin DAP. Para comprobar la presencia del inserto *asd* se realizó PCR, y para comprobar la presencia del híbrido se digirió con NcoI y BamHI (Fig. 7).

La digestión también liberó el fragmento de 1,4 kb correspondiente a *asd* (Fig 7), que está flanqueado por sitios BamHI localizados inmediatamente al interior del gen *asd*, a continuación de los Scal (tabla I), considerados en el diseño original de los partidores para amplificar este gen desde *E. coli* (García de la Guarda, 1998).



Se escogió un clon positivo de cada construcción y se transformó la cepa de *Salmonella typhimurium* χ 3730 (*asd*⁻). Los transformantes se seleccionaron en

placas de agar LB suplementadas con estreptomicina (50 $\mu\text{g/ml}$), sin DAP. Se comprobó la integridad de la construcción mediante digestión con NcoI y BamHI (no mostrado). Puesto que no se disponía de cepas de *Salmonella* que poseyeran en su genoma el gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7, necesaria para la transcripción de los constructos en pET27b, luego de comprobada la integridad de los constructos, se transformó con ellos la cepa *S. typhimurium* χ 4550 que contenía el plásmido pGP1-2, que porta este gen, y se seleccionó en placas de agar LB suplementadas con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). Se seleccionó al azar colonias transformantes, que se crecieron durante la noche para inducirlas al día siguiente como se describe en *Materiales y Métodos*, punto 13. Se comprobó la expresión mediante Western blot contra CT2 y se detectó un clon positivo para NTJ/CT2 y cuatro para NTG/CT (Fig. 8).



5. Estudio de expresión de los antígenos c-HpaA/CT2 y NT/CT2 en la cepa vacuna *S. typhimurium* χ 4550

Previamente se había comprobado que la expresión de ciertas fusiones con el CT de VacA en *E. coli* causa la lisis de la bacteria, notoria a partir de la primera hora de inducción del gen híbrido. Se construyeron curvas de crecimiento de los clones χ 4550 pGP1-2 que expresan c-hpaA/CT2, NTJ/CT2 y NTG/CT2 en pET27b *asd*, con el fin de evaluar el efecto de la expresión heteróloga de estos antígenos en *Salmonella typhimurium*. Se indujo los clones como si se preparasen las dosis de vacunación para ratones (ver *Materiales y Métodos*, punto 15), pero no se detuvo el crecimiento, sino que se continuó a 42°C por tiempos mayores (Fig. 9). Cada 15 o 30 minutos se tomó alícuotas, se preparó diluciones seriadas y se sembró en placas de agar LB para determinar el número de bacterias viables. Se construyó una curva de crecimiento después de inducir y se observó que el número de bacterias viables baja inicialmente, para luego volver a subir, en el caso de c-hpaA/CT2, o estabilizarse, en los otros casos. El clon que expresa c-hpaA/CT2 presenta un crecimiento similar tanto con el inductor como sin él, luego de 2 h de agregado éste (Fig. 9 A), mientras que los clones que expresan NT/CT2 presentan una disminución de cerca de 4 unidades logarítmicas, estabilizándose en 1×10^6 CFU/ml en el caso de NTJ/CT2, y en 2×10^5 CFU/ml, en el de NTG/CT2 (Fig. 9 B, C).

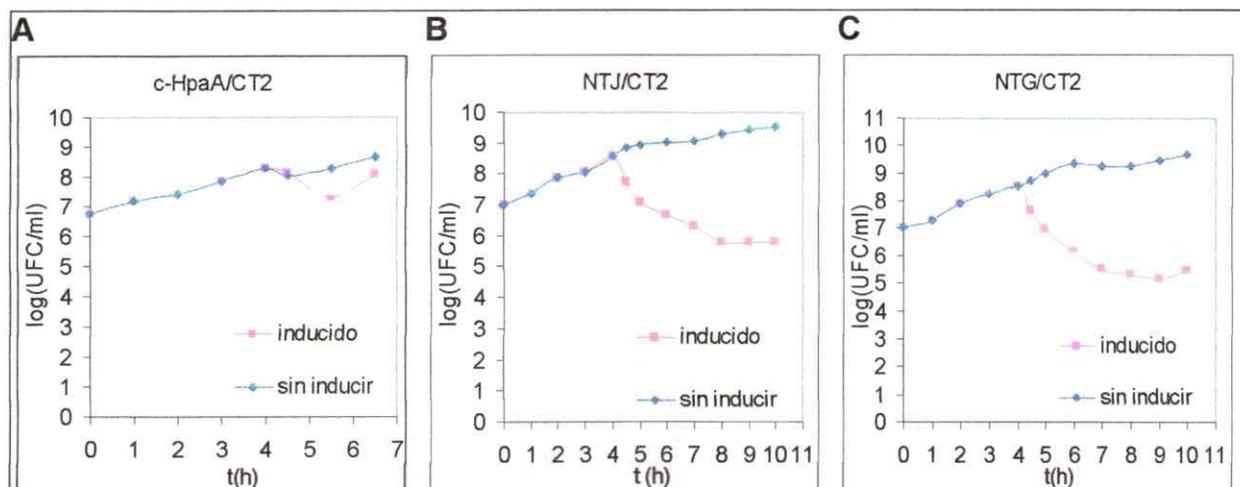


Figura 9: Crecimiento de los clones que expresan quimeras con CT2

A) Comparación del crecimiento con y sin inducción del clon que expresa c-hpaA/CT2

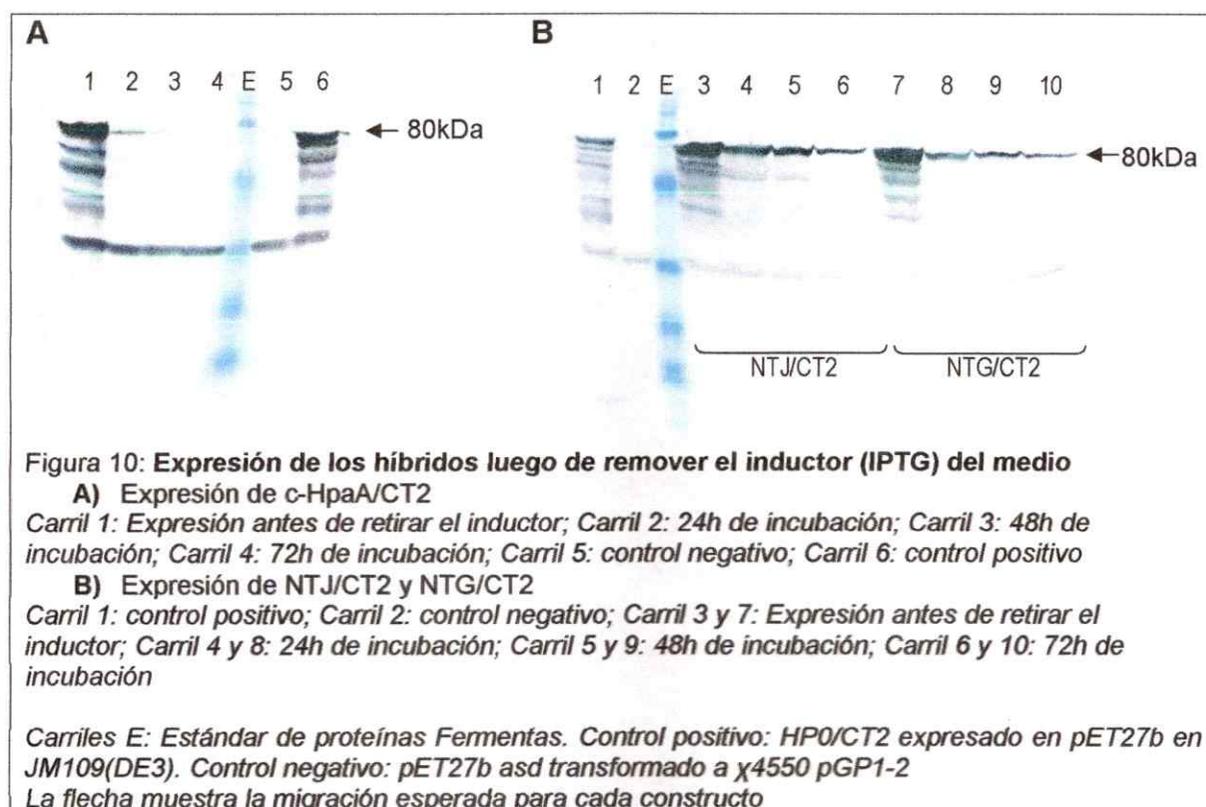
B) Comparación del crecimiento con y sin inducción del clon que expresa NTJ/CT2

C) Comparación del crecimiento con y sin inducción del clon que expresa NTG/CT2

Se indujo, en todos los casos, luego de 4h de crecimiento, con IPTG 1mM y crecimiento a 42°C. Se midió viabilidad según se indica en *Materiales y Métodos*, punto 9.

Para que la vacunación pueda generar respuesta inmune contra el antígeno de interés es necesario que la cepa vacuna lo exprese por un tiempo adecuado. Se determinó la expresión de los híbridos en la cepa vacuna *S. typhimurium* χ 4550 luego de retirar el inductor de pET27b (IPTG) mediante lavado y recultivo por un período mayor al necesario para preparar las dosis, sin suplementar con antibióticos o IPTG. Se observó que el nivel de expresión de c-HpaA/CT2 disminuye a medida que aumenta el período de incubación. Luego de 72 h la cantidad presente es mucho menor que al inicio del experimento, aunque aún es posible detectarla (Fig. 10 A). Sin embargo, luego del mismo tiempo de crecimiento continuo después de retirar el inductor, el nivel de expresión de los híbridos NT/CT2 no disminuyó tan notoriamente como el de c-HpaA/CT2 (Fig. 10 B). Esto podría explicar la diferencia en el crecimiento observada entre las cepas

que expresan las proteínas híbridas (Fig. 9); aquella que porta c-HpaA/CT2 perdería su expresión a lo largo del tiempo, lo que le permitiría recuperar su tasa de crecimiento luego de inducir, mientras que aquellas cepas que portan el híbrido NT/CT2 mantienen su expresión, a costo de reducir su densidad poblacional.



Puesto que en este experimento el medio fue renovado cada día, se mantuvo un tiempo de duplicación generacional relativamente corto, no comparable a las condiciones presentes en el interior de los ratones, bajo las cuales se ha visto que *Salmonella* presenta un tiempo de duplicación generacional de unas 5 h (Björkman y cols., 2000). Entonces, este experimento sugiere que no es necesario suministrar externamente el inductor a los ratones para inducir la

expresión de los híbridos en las bacterias, sino que basta inducir el cultivo con IPTG, durante al menos una hora antes de preparar las dosis de vacunación.

Los datos obtenidos respecto a las características intrínsecas de las cepas que portan cada híbrido genético fueron sopesados para elegir el candidato más adecuado para la vacunación. Se le dio más peso en la toma de la decisión a los niveles de crecimiento respecto de la DO_{600} , por lo que el antígeno elegido para la vacunación fue c-HpaA/CT2. La mayor tasa de crecimiento de la cepa que porta este híbrido permite que la dosis de vacunación presenten la mayor proporción de bacterias vivas respecto del total, lo que permite la comparación de los resultados con otros estudios publicados en literatura, a la vez que se mantiene un volumen de dosis adecuado (100 a 200 μ l) para trabajar con ratones, lo que no habría sido posible en el caso de las otras dos cepas obtenidas, considerando diferencias en proporción de bacterias viables de hasta 4 órdenes de magnitud.

Se analizó la expresión del híbrido c-hpaA/CT2 luego de inducir un cultivo del clon χ 4550 pGP1-2 correspondiente sólo con IPTG 1mM (manteniendo la temperatura en 37°C) o sólo con aumento de temperatura a 42°C (Fig. 11). Se encontró que la inducción con IPTG (que libera el represor lac del promotor de pET27b, permitiendo la transcripción del híbrido) es suficiente para expresar c-hpaA/CT2, mientras que la temperatura (que causa la proteólisis del represor cl que controla la transcripción de T7 RNA polimerasa) no lo es. Es posible ver una expresión detectable a partir de los 30 minutos de inducción con IPTG 1mM,

siendo la expresión óptima a las 2 h post inducción con IPTG. Estos datos sugieren que no es necesario inducir con un pulso a 42°C las cepas a utilizar como vacuna, aunque, por mayor seguridad, se decidió darlo de todas maneras. Además, puesto que la expresión óptima es obtenida a las 2 h post inducción, el tiempo de inducción no necesita ser muy largo. Se decidió, por razones de facilidad técnica para los experimentos de preparación de las dosis, utilizar 1 h de inducción a 42°C.

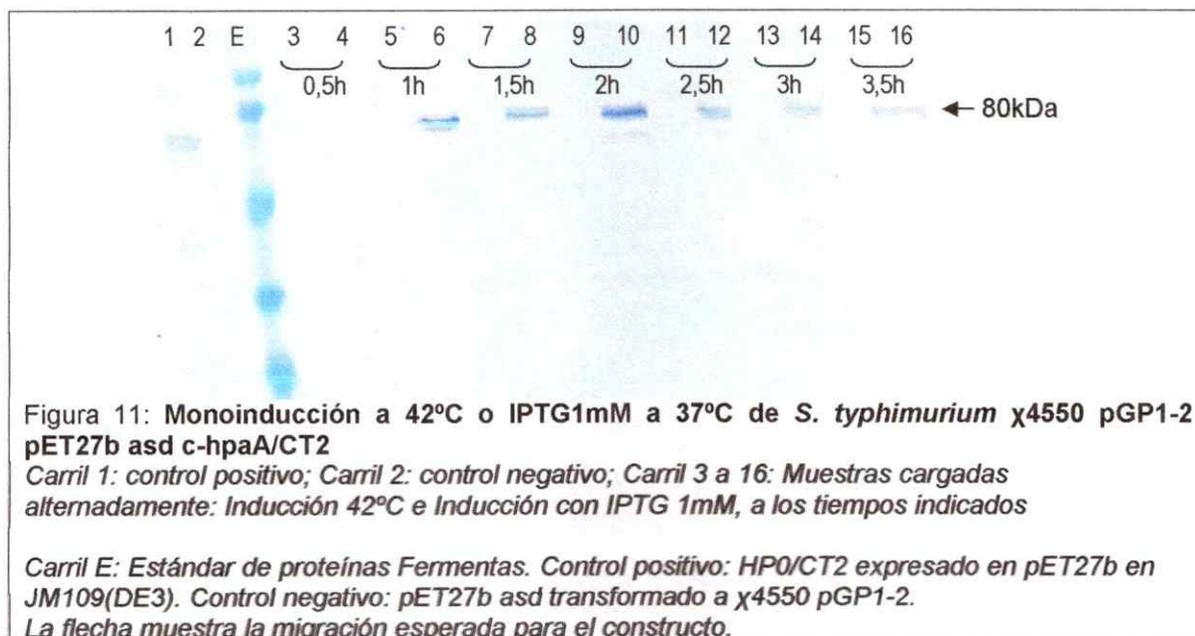


Figura 11: Monoinducción a 42°C o IPTG1mM a 37°C de *S. typhimurium* χ 4550 pGP1-2 pET27b asd c-hpaA/CT2

Carril 1: control positivo; Carril 2: control negativo; Carril 3 a 16: Muestras cargadas alternadamente: Inducción 42°C e Inducción con IPTG 1mM, a los tiempos indicados

Carril E: Estándar de proteínas Fermentas. Control positivo: HP0/CT2 expresado en pET27b en JM109(DE3). Control negativo: pET27b asd transformado a χ 4550 pGP1-2.

La flecha muestra la migración esperada para el constructo.

6. Exposición de los antígenos de *H. pylori* en la superficie de la cepa vacuna

Para comprobar que los antígenos clonados estuvieran expuestos en la superficie bacteriana de las cepas transformadas, las bacterias enteras que expresan c-HpaA/CT2 y NT/CT2, luego de inducir con IPTG 1mM a una

temperatura de 42°C por 1h, se digirieron con tripsina. El ensayo de digestión se realizó según se describe en *Materiales y Métodos*, punto 14, y los antígenos fueron detectados mediante Western blot (Fig. 12 A, B).

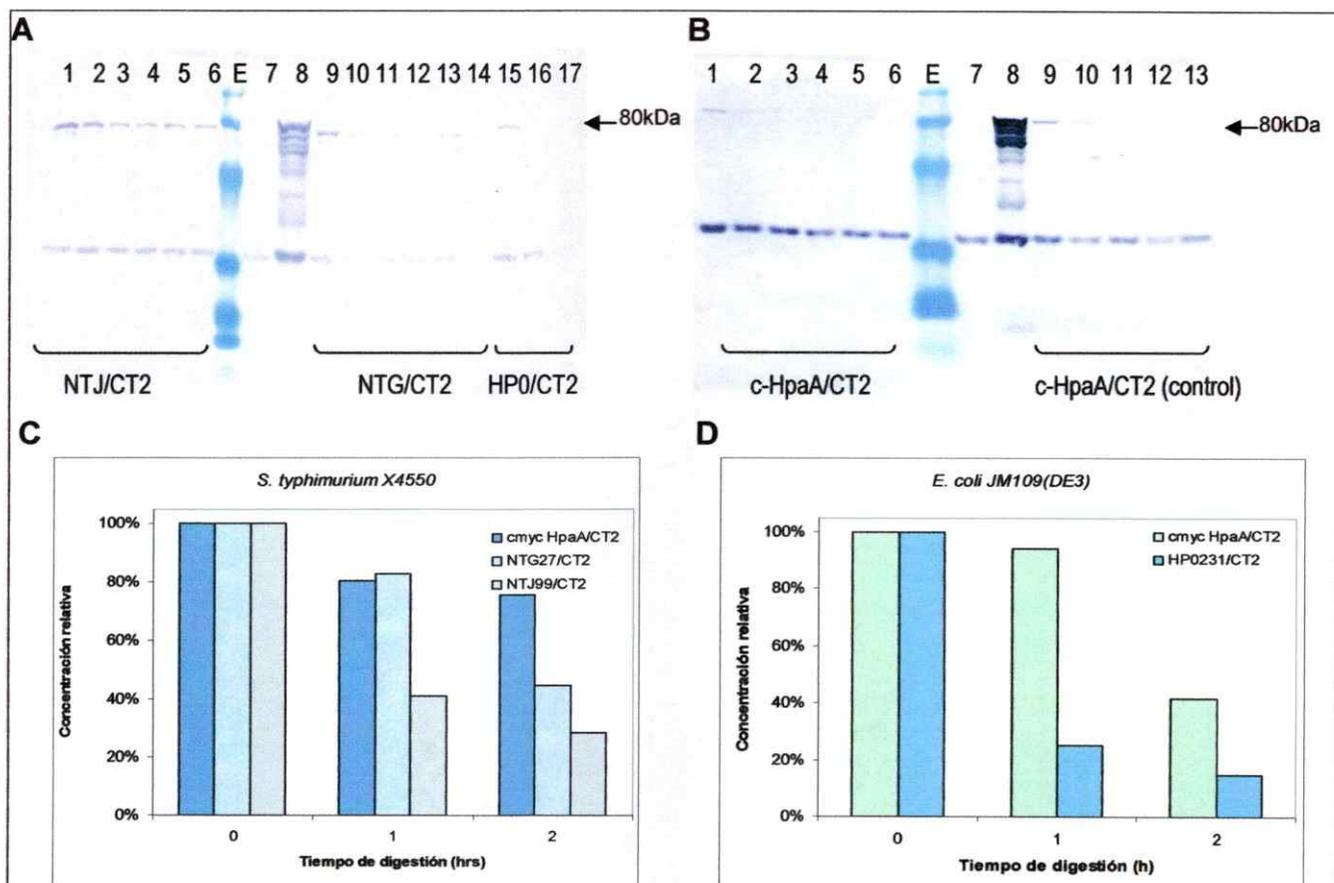


Figura 12: Localización de híbridos c-HpaA/CT2 y NT/CT2 en la superficie de *S. typhimurium* χ 4550 por digestibilidad de bacterias enteras ante tripsina e inmunodetección del antígeno

A) Digestión de cepas que portan los híbridos NT/CT2

Carriles 1 a 6: NTJ/CT2 digerido durante 0, 1, 2, 3, 4 y 14 h; Carril 7: Control negativo WB; Carril 8: Control positivo WB; Carriles 9 a 14: NTG/CT2 digerido durante 0, 1, 2, 3, 4, y 14 h; Carriles 15 a 17: Control positivo de digestión HP0/CT2 digerido durante 0, 1 y 2 h.

B) Digestión de cepa que porta el híbrido c-HpaA/CT2

Carriles 1 a 6: c-HpaA digerido durante 0, 1, 2, 3, 4 y 14 h; Carril 7: Control negativo WB; Carril 8: Control positivo WB; Carriles 9 a 13: Control positivo de digestión c-HpaA/CT2

C) Disminución relativa de los híbridos expresados en χ 4550 y digeridos por distintos tiempo

D) Disminución relativa de híbridos control expresados en JM109(DE3).

Carriles E: Estándar de proteínas Fermentas. Control positivo WB: HP0/CT2 expresado en pET27b en JM109(DE3), sin tripsina. Control negativo WB: pET27b transformado a JM109(DE3). Controles positivos de digestión: HP0/CT2 y c-HpaA/CT2 expresados en pET27b en JM109(DE3) (accesibles a tripsina; Martínez, 2006). Por simplicidad visual, en los gráficos C y D sólo se muestran tres tiempos. Se asignó 100% a la intensidad inicial de la banda medida con el programa ImageJ

La flecha indica la migración esperada y el peso de los constructos

Puesto que la tripsina es una proteasa incapaz de penetrar las membranas bacterianas, sólo digirá lo que se exponga hacia el exterior. La disminución relativa de la banda superior se determinó evaluando la intensidad de cada una de ellas por densitometría con el programa computacional ImageJ (Abramoff y cols., 2004). Se observó que la cantidad de cada antígeno disminuyó en el tiempo de ensayo, sugiriendo que las quimeras están expuestas hacia el exterior en la superficie de las bacterias (Fig. 12 C, D), tal como se propuso en los objetivos

7. Ensayos de vacunación en ratones

Debido a problemas de diseño como estabilidad de la cepa con cada construcción híbrida, y costos de la experimentación, en este estudio sólo se probó una de las construcciones como vacuna en ratones. El antígeno elegido fue c-HpaA/CT2, tal como se mencionó anteriormente, debido a que presenta la mejor tasa de recuperación del crecimiento luego de inducción con IPTG de los tres híbridos estudiados (Fig. 9).

Los ratones se inmunizaron y desafiaron según se describe en *Materiales y Métodos*, punto 17. Dentro de los 7 días siguientes a la administración de las dosis de vacunación y controles, se produjo la muerte de 4 ratones del grupo vacuna, por lo que se decidió complementar con un grupo nuevo, desfasado en el tiempo, que también fue vacunado siguiendo el mismo protocolo utilizado para el grupo principal. Al finalizar el experimento se comparó los resultados obtenidos entre el

grupo vacuna original y el desfasado y no se observaron diferencias, por lo que todos los datos se trataron como un grupo único.

Al final del ensayo los animales se sacrificaron y se midió la inmunogenicidad del híbrido por la tasa de anticuerpos en suero (título) mediante ELISA, y su efecto protector mediante determinación de colonización por *H. pylori* P76 luego del desafío realizado en la semana 11 post inmunización, según se detalla en *Materiales y Métodos*, puntos 17 y 18.

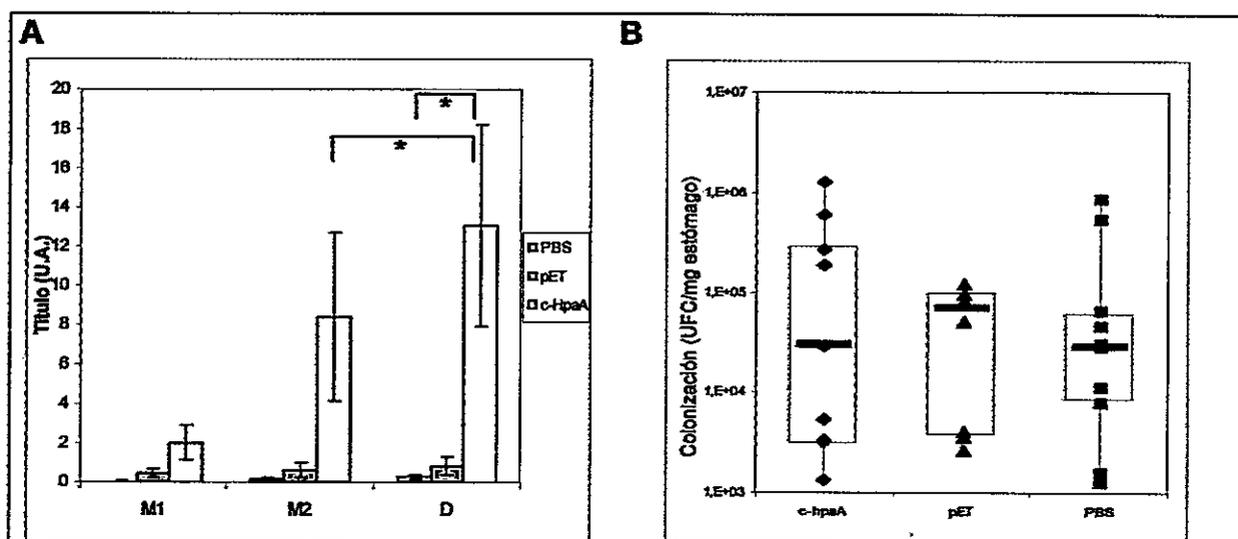


Figura 13: Comparación del título de anticuerpos séricos anti HpaA y colonización estomacal por *H. pylori* P76 de ratones inoculados con la cepa vacuna que expresa c-HpaA/CT2 o los controles, y posteriormente desafiados con *H. pylori* P76

A) Variación del título de anticuerpos anti HpaA séricos a distintos tiempos para cada tratamiento, medidos por ELISA.

Se grafica la media como barra y el error estándar mediante líneas. En todos los casos se restó el valor obtenido en la muestra preinmune. *: $p < 0,05$ según test de comparación múltiple de Dunn.

B) Colonización de estómagos de ratones luego del desafío con 1×10^7 UFC de *H. pylori* P76.

La caja representa el 75% de los datos. La línea horizontal representa la mediana. Las diferencias no son significativas, $p = 0,9$ según test de Kruskal Wallis.

c-HpaA: grupo inmunizado con la cepa vacuna. pET: control inoculado con la cepa sólo con el plásmido pET27b asd. PBS: control inoculado sólo con el vehículo de administración. M1: muestra de suero inmune a la semana 5. M2: muestra de suero inmune en la semana 9. D: muestra de suero inmune en la semana 14, 3 semanas luego del desafío

Se encontró que el título de anticuerpos aumentaba en todos los grupos luego de la inmunización primaria (Fig. 13 A), notable particularmente en el grupo vacunado, mientras que los grupos controles presentan una variación menor. Se aplicó el test de comparación múltiple de Dunn al aumento del título de anticuerpos 3 semanas luego de desafiar con 1×10^7 UFC de *Helicobacter pylori* P76 (Fig. 13 A). Se comprobó que no existían diferencias significativas entre la respuesta inducida sólo por el vehículo de inoculación (grupo PBS) o la cepa que contiene el plásmido sin inserto (grupo pET, $p > 0,05$). El grupo vacunado presentó un título significativamente mayor que el control PBS ($p < 0,05$), aunque no hubo diferencias significativas con el grupo pET (Fig. 13 A), probablemente debido a la gran variabilidad encontrada en el grupo vacunado, que se refleja, en el gráfico, en una amplia barra de error (Fig. 13 A).

Los resultados de serología sugieren que la inoculación de ratones con la cepa vacuna que expresa c-hpaA/CT2 induce una buena respuesta inmune específica contra la quimera, resultado que, sin embargo, no se ve reflejado en una disminución de la colonización (Fig. 13 B), en la que no se observó diferencias significativas ($p = 0,9$, test de Kruskal Wallis). Además, no fue posible encontrar correlación entre el título de anticuerpos por ratón y la colonización de su estómago (datos no mostrados). Estos resultados indican que los ratones vacunados pudieron reconocer el antígeno expresado en la cepa vacuna, pero la respuesta inmune inducida por éste no fue suficiente para erradicar o reducir

significativamente la colonización por el patógeno *H. pylori* en el subsecuente desafío.

Se midió la producción de citoquinas a partir de esplenocitos aislados de los bazos de los ratones inoculados y de macerados de estómagos, con la intención de determinar una desviación de la respuesta hacia Th1 o Th2. Los ratones del grupo vacuna presentaron una respuesta de citoquinas similar a la observada en los grupos controles, según los test estadísticos aplicados (Tabla 2). Respecto al análisis histológico del estómago, no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

Tabla II: Niveles de citoquinas en homogeneizados de estómago de ratones vacunados y controles

	PBS	pET	HpaA	p
IFN γ	3 \pm 0,9	2,4 \pm 0,7	3,3 \pm 1,4	0,14
IL-10	59 \pm 52	57 \pm 34	86 \pm 55	0,29
IL-12	7,4 \pm 5	6,2 \pm 3	7,1 \pm 3	0,7
IL-4	17 \pm 20	12 \pm 14	28 \pm 26	0,2
TGF- β 1	304 \pm 313	309 \pm 97	205 \pm 91	0,07

Los valores se muestran en pg de citoquina/mg proteínas totales. Los resultados no presentan diferencias significativas según test de Kruskal Wallis ($p > 0,05$)

DISCUSIÓN

La investigación actual indica que *Helicobacter pylori* es un patógeno ubicuo, que infecta, en promedio, a la mitad de la población mundial. Esta bacteria ha colonizado el estómago humano de manera persistente por tanto tiempo que es posible trazar las líneas de migración de poblaciones ancestrales a través del análisis de las variaciones genéticas encontradas en ella (Falush, y cols. 2003). Desde la prehistoria hasta ahora la expectativa de vida de los seres humanos ha aumentado al menos tres veces, extendiendo el tiempo de interacción entre los microorganismos y su hospedador. Esto permitió que actualmente se manifiesten algunos efectos adversos causados por la infección crónica del microorganismo, que lo convierten en un patógeno más agresivo. En el caso de *Helicobacter pylori*, se han manifestado afecciones como las úlceras, el linfoma MALT y el cáncer gástrico.

Es sabido que las células carcinogénicas acumulan mutaciones. Investigaciones recientes han demostrado que *H. pylori* es capaz de generar mutaciones en las células del epitelio gástrico, principalmente por alteraciones del marco de lectura (Yao y cols., 2006). A partir de este estudio y sus predecesores podemos inferir que la infección crónica con *H. pylori* es potencialmente peligrosa para su hospedero, y que el desarrollo de nuevas estrategias para su eliminación es de gran relevancia en la actualidad para el control del cáncer gástrico.

Actualmente se está probando varias estrategias de vacunación, que incluyen uso de probióticos, antígenos purificados o clonados en plantas, vacunas de DNA y expresión heteróloga en cepas atenuadas (Chmiela y Michetti, 2006; D'Elíos y Andersen, 2007). Recientemente, incluso se han realizado algunas pruebas en humanos, utilizando cepas de *Salmonella* atenuadas que expresan antígenos de *H. pylori* heterológamente (Aebischer y cols., 2005). En dicho contexto, este trabajo propone la utilización de una cepa atenuada que expresa en su superficie antígenos de *H. pylori* como vacuna en el modelo murino.

En este trabajo se construyeron tres híbridos genéticos capaces de ser expresados heterológamente tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*, mediante el sistema pET, que utiliza, de manera inducible, el promotor del fago T7. Puesto que este promotor sólo es reconocido por la RNA polimerasa de dicho fago, y no por la de la bacteria, fue necesario utilizar cepas de *E. coli* especiales (del tipo DE3), que tienen en su genoma un lisógeno de fago lambda que porta el gen de la enzima requerida, o, en el caso de *Salmonella*, de un plásmido adicional, pGP1-2 (Tabor y Richardson, 1985), que contiene su gen codificante. Se escogió un sistema inducible debido a trabajos previos en el laboratorio, que compararon el resultado de inoculaciones a ratones con cepas atenuadas, que expresan de manera inducible o constitutiva el mismo antígeno. En dicho trabajo se encontró que la respuesta inmune es más fuerte al utilizar antígenos de expresión inducible, presumiblemente porque mantiene la integridad de los mismos, o se produce una expresión mayor en el sistema inducible (García de la Guarda, 1998).

Los antígenos se utilizaron fusionados al carboxilo terminal de la citotoxina VacA, que actúa como dominio autotransportador para la toxina funcional en *H. pylori* (Fisher, y cols., 2001). En el sistema heterólogo, el dominio autotransportador de VacA posiciona en membrana externa las construcciones, resultando en una manera simple y eficiente de exponer en la superficie bacteriana los antígenos al sistema inmune, una vez inoculadas las cepas vacuna en los animales de experimentación. Los sistemas de autoexposición como el utilizado en este trabajo tienen numerosas ventajas, tanto en el campo de la investigación biológica básica como en el aplicado de la biotecnología (Kramer y cols., 2003; Jose, 2006), y actualmente se están desarrollando vacunas utilizando este método, incluyendo algunas contra *Helicobacter pylori* (Rizos y cols., 2003).

Al iniciar esta tesis se propuso la construcción de híbridos fusionados a carboxilo terminal de VacA de dos fragmentos de la proteína CagA, uno que comprende la región entre los aminoácidos 100 al 288 (en J99) y otro que comprende los aminoácidos 834 al 1047 (en J99). Este último, designado A17C fue clonado para las cepas J99 y G27, pero no fue posible obtener expresión en *E. coli*, por lo que no se continuó con este enfoque. El análisis de secuencia del sector N – terminal no reveló problemas esperables en la traducción (presencia de otros codones de inicio, *stops* tempranos o codones de bajo uso en *E. coli*) que podrían haber bloqueado la traducción o generado una proteína trunca (Fig. 14, Anexo 1). El motivo de la falta de expresión no fue dilucidado, aunque es posible

que se haya producido alguna mutación en un sector previo al ATG inicial o posterior al segmento secuenciado, como la región de VacA, que podría ser causal de error en el marco de lectura o generación de un codón stop. De esta manera, se produciría una proteína trunca que no sería detectada por Western blot, ya que se utilizó un anticuerpo contra VacA. En cualquier caso, una construcción con una falla de este tipo no tendría utilidad en el sistema de la vacuna propuesta, pues no dispondría del segmento responsable de la presentación y anclaje del antígeno en la superficie bacteriana.

Otra de las construcciones utilizadas en este trabajo fue una sección en el sector amino terminal de CagA (aminoácidos 100 a 288 en la cepa J99). Se eligió esta sección porque contiene una secuencia putativa de reconocimiento para quinasas eucariontes, aunque su presencia no es determinante en la inducción del fenotipo *colibrí* en células en cultivo (Backert y cols., 2000). Se utilizó una cepa intrínsecamente incapaz de producir dicho fenotipo (J99) y otra que sí es capaz de ello (G27), con el objetivo futuro de comparar si existen diferencias en la inmunidad determinada por cada una de ellas. Si bien no se inmunizó ratones con estas construcciones, se observó que al inducir la expresión de ellas en *Salmonella* se produce una notoria baja en la viabilidad bacteriana (una de las razones por la que se desestimó el uso de estos híbridos como vacuna), estabilizándose el cultivo en 1×10^6 UFC/ml en el caso del híbrido de J99 y 2×10^5 UFC/ml, en el de G27 (mientras que, sin inducir, el cultivo sigue creciendo por sobre 10^9 UFC/ml). La baja en la viabilidad ocasionada al inducir la expresión de

proteínas heterólogas no es extraña, especialmente si los niveles de proteína heteróloga son muy altos. Ya se había probado en el laboratorio que la expresión del carboxilo terminal de VacA, o híbridos con éste, en *E. coli*, causa lisis bacteriana, de lo que se infiere que los híbridos presentan algún grado de toxicidad. Sin embargo, en las cepas de *Salmonella* ensayadas en el laboratorio hasta ahora no se había encontrado un comportamiento tan severo.

Resulta interesante que los niveles de toxicidad parecen ser mayores en el híbrido NTG/CT2 que en aquél de J99. El sector N – terminal de la proteína CagA es bastante conservado, según se ha reportado, por lo que esta diferencia no se resulta simple de explicar. Es posible argumentar que el nivel de expresión de NTG/CT2 sea mayor que el de NTJ/CT2, y que esta podría ser la causal de la diferencia en la baja de viabilidad de las bacterias. Sin embargo, al determinar la cantidad relativa producida al inducir cada construcción se observó que el nivel de expresión de NTG/CT2 es menor que el del híbrido J99, siendo este último un 25% más alto (datos no mostrados, obtenidos con el programa ImageJ, comparando la intensidad relativa de la banda de Western blot respecto a la de reacción cruzada obtenida al detectar con AK204 como primer anticuerpo). Comparando la secuencia obtenida de un clon de NTG/CT2 con la publicada para cagA de J99 (Fig. 15, Anexo 2) se observan algunas diferencias, pero la más notable es la presencia de un segmento de 12 nucleótidos extras en la secuencia de J99, que comprende las bases 608 a 620. Extendiendo la comparación a otras

secuencias publicadas de *cagA*, se encuentra que sólo un grupo, en el que se encuentra la cepa J99, tiene este segmento (Fig. 16, Anexo 2).

En estudios previos del laboratorio, se ha demostrado que el carboxilo terminal de VacA es capaz de formar multímeros de al menos 3 unidades, que forman un poro a través del cual es transportado el dominio pasajero (Martínez, 2006). Tal como se mencionó anteriormente, la expresión de CT2 causa lisis en *E. coli*, y existe la probabilidad que ella sea causada por la inclusión en membrana de CT2, que formaría algún tipo de canal por el que podrían entrar o salir algunas sustancias importantes para la bacteria, o bien desestabilizaría la membrana externa, ya sea por el tamaño del poro formado o por su mala inserción en ella, debida a la falta de una secuencia señal adecuada (Pugsley, 2007, comunicación personal). Datos preliminares indican que las fusiones a CT2 son causales de menor lisis en *E. coli* que el dominio autoexpositor por sí solo, lo que podría relacionarse con la presencia del segmento proteico correspondiente al antígeno en el interior del canal o en su abertura exterior, lo que modificaría la permeabilidad o el plegamiento general de la proteína, favoreciendo la sobrevivencia de la bacteria. A partir de esta hipótesis, puede postularse que los 4 aminoácidos adicionales del segmento NTJ/CT2 le den una estructura tal que disminuya el efecto lítico de la inclusión del híbrido en la membrana. El segmento extra incluye una prolina, aminoácido conocido por su efecto disruptor de estructuras, y una glicina, que, gracias al pequeño tamaño de su grupo radical, permite movimientos de torsión mayores y más libres que el resto de los

aminoácidos. En este contexto, el efecto estructural podría ser una explicación plausible, la estructura adoptada por el híbrido NTJ/CT2 podría ser más estable en la membrana externa de *Salmonella* y *E. coli*, por lo que su expresión sería menos tóxica que la del híbrido más similar, NTG/CT2.

Se ha demostrado que en todos los Gram negativos existe un homólogo de la proteína chaperona Omp85, descubierta en *N. meningitidis*, que es esencial para la inserción de las proteínas de membrana externa (Voulhoux y cols., 2003). Una región de unos 10 aminoácidos ubicados en el C-terminal de las proteínas de membrana sirve como reconocimiento a la chaperona Yate (homólogo de Omp85) en *E. coli*, y se ha descubierto que la señal es especie – específica (Robert y cols., 2006). En este contexto, es posible que la secuencia señal del autotransportador CT2 no sea reconocida eficientemente por la chaperona Omp85 en *Salmonella*, lo que causaría problemas de plegamiento en la membrana. Esta situación podría ser revertida si se modifican los aminoácidos ubicados en la región C- terminal de CT2, de modo que sea similar a la de las proteínas de membrana externa nativas. Esta vía de razonamiento será probada en el futuro en el laboratorio.

En los clones que expresan el híbrido c-HpaA/CT2, también se encontró una reducción de la viabilidad, producida al momento de la inducción por IPTG y temperatura, aunque el crecimiento era recuperado al cabo de una hora luego del inicio de ésta, y en ningún caso la disminución de la viabilidad fue tan fuerte como en las construcciones NT/CT2 (las UFC sólo bajan una unidad logarítmica), razón

por la cual la elección de este híbrido en los ensayos de vacunación parecía ser la más acertada. Es importante notar que la expresión de este híbrido, así como de los híbridos NT/CT2, se mantiene en el tiempo por al menos 72 h (fig. 10). El hecho que no se reduzca la cantidad de proteína luego de remover el inductor del medio puede explicarse a través de la pequeña cantidad de IPTG unido al represor LacI que queda en el interior de las bacterias y, probablemente, una estabilidad razonable de la quimera proteica una vez ensamblada en la membrana externa de la cepa vacuna. En el experimento realizado el medio se cambió cada día, por lo que el tiempo generacional se mantiene relativamente corto durante todo el ensayo. Considerando que en el interior del ratón el tiempo generacional es mucho mayor (Björkman y cols., 2000), es posible que el recambio de IPTG, necesario para permitir la transcripción desde el vector pET27b, sea menor, y, por ende, el efecto sea más duradero. El gen de la RNA polimerasa del fago T7 contenido en el plásmido pGP1-2 está controlado por el represor cI del fago lambda, cuya transcripción está, a su vez, bajo el control del promotor lac, inducible por IPTG. Esto implica que bajo las condiciones de inducción con IPTG, se aumenta la producción del represor cI, aunque al ser éste termosensible, no es capaz de reprimir totalmente la producción de RNA polimerasa del fago T7 en las condiciones de trabajo (37°C o 42°C). La progresiva disminución del IPTG esperada en el experimento de lavado del inductor tendría, entonces, dos efectos. Por un lado, la menor cantidad de IPTG produciría una mayor represión del híbrido en pET27b, mediada por el represor LacI; pero, por otro lado, la falta de IPTG reduce la cantidad del represor cI, aumentando la cantidad relativa de RNA

polimerasa T7. Este último efecto podría compensar la mayor represión del híbrido, ayudando a mantener la expresión por un tiempo mayor.

En las tres construcciones híbridas que fueron expresadas en *Salmonella* se demostró, mediante digestiones con tripsina, que la fusión con el carboxilo terminal de VacA permite su exposición al medio externo. Esta proteasa es incapaz de penetrar la membrana externa bacteriana, por lo que la digestión de células enteras con ella es una poderosa herramienta para determinar el posicionamiento externo de ciertas proteínas. Se observó en este experimento que la digestión de los controles en *E. coli* (HP0/CT2 y c-HpaA/CT2) es más rápida que los antígenos ensayados en *Salmonella*. Esto podría deberse a la mayor accesibilidad que presenta la membrana externa de *E. coli* respecto a la cepa de *S. typhimurium* utilizada. Se han reportado diferencias entre la configuración molecular de la membrana de ambas bacterias, como, por ejemplo, variaciones en el largo y composición de los antígenos asociados al LPS. Particularmente, para cepas derivadas de *E. coli* K-12 se ha descrito la presencia de dos mutaciones que impiden la síntesis del antígeno O (Stevenson y cols., 1994), lo que permitiría el fácil acceso de la tripsina a los antígenos expuestos en la membrana, a diferencia de la cepa χ 4550, que posee el LPS completo. Observaciones similares ya habían sido realizadas en el laboratorio, utilizando otros antígenos de *H. pylori* expresados en *Salmonella* mediante el sistema de acopiarlos al autotransportador CT2 (Martínez, 2006).

En un trabajo anterior se demostró que es posible expresar de manera viable antígenos heterólogos mediante autoexposición en membrana externa de *E. coli* y *S. typhimurium*, y utilizarlos en una cepa vacuna como χ 4550 para inmunizar ratones (Martínez, 2006). En este trabajo se ha extendido el número de antígenos utilizados en la construcción de híbridos, y se ha determinado el efecto protector que uno de ellos posee ante desafío con *H. pylori* en ratones BALB/c. La construcción híbrida ensayada en este trabajo, c-HpaA/CT2, fue reconocida como inmunógeno por los ratones, como lo demuestra el título de anticuerpos específicos contra HpaA (Fig. 13 A). Sin embargo, el efecto inmunogénico no estuvo asociado a una variación en los niveles de citoquinas del estómago (Tabla II), ni a un efecto protector contra *H. pylori* P76, puesto que no se observó diferencias significativas en la colonización del estómago por parte de esta bacteria, tres semanas después del desafío (Fig. 13 B). Es poco probable que la ausencia de protección se deba a diferencias en la secuencia del antígeno HpaA, puesto que se ha descrito que esta proteína es altamente conservada en *H. pylori*, con una identidad aminoacídica entre cepas sobre el 95% (Müller y cols., 2002), y una homología de 99%, según una comparación de las secuencias publicadas en GenBank. Alternativamente, es posible proponer que la expresión de HpaA fusionada como híbrido a CT2 cambie la estructura de la proteína, lo que la haría diferente a la estructura nativa encontrada en *H. pylori* P76 y podría ocasionar problemas en el reconocimiento de esta última por parte del sistema inmune. Puesto que la citotoxina VacA es secretada mediante un sistema autotransportador, posee una estructura modular, en la que cada dominio posee

un plegamiento independiente (Desvaux y cols., 2004); el dominio CT2 cumple la función de autotransportador, por lo que el plegamiento del dominio pasajero, en este caso, de c-HpaA, no debería verse afectado. También es posible que la expresión de este híbrido en un hospedador heterólogo como *Salmonella* puede limitar el plegamiento nativo de HpaA; sin embargo, se ha reportado que HpaA recombinante expresada heterológamente presenta características similares a las observadas en la proteína nativa (Lundström y cols., 2003), y, además, el procesamiento de los antígenos por parte del sistema inmune implica la ruptura proteolítica de los mismos, y exposición de los polipéptidos derivados de este procesamiento en los complejos principales de histocompatibilidad (MHC) con un tamaño de entre 9 a 12 aminoácidos, si se trata de MHC I, o algo más de 13 aminoácidos, en el caso de MHC II (Purcell y Gorman, 2004). Por estos antecedentes se deduce que la estructura no necesariamente es un factor determinante en la respuesta inmune contra una proteína a la cual el sistema inmune ya ha sido expuesto. La producción de anticuerpos contra HpaA en los ratones inmunizados demuestra que la cepa vacuna fue procesada por el sistema inmune y que péptidos del híbrido fueron expuestos en MHC, de clase I (encargados de péptidos intracelulares) o clase II (encargados de péptidos extracelulares), por lo que podría ser reconocida por las células inmunes.

Durante el desarrollo del protocolo de vacunación algunos ratones murieron antes de finalizar el tratamiento. A estos animales se les extrajo el estómago y el hígado, que fueron tratados para determinar presencia bacteriana en ellos. No se

observó organismos similares a *H. pylori* en los estómagos de los ratones muertos antes del desafío, y aproximadamente luego de un mes de la vacunación, ya no se observó colonización de órganos internos como bazo o hígado por *Salmonella*. La mayoría de los ratones muertos pertenecía al grupo vacunado, por lo que es posible que la vacuna haya tenido algún efecto adverso sobre ellos. Una posibilidad es que los ratones hayan presentado una respuesta inmune muy fuerte contra el híbrido c-HpaA/CT2, que habría resultado en una merma en su salud. Sin embargo, existen varios estudios en los que se ha utilizado HpaA, tanto purificada como expresada en bacterias, en los que no se ha observado respuestas inmunes adversas (Mao y cols., 2005; Nyström y Svennerholm, 2007; Sutton y cols., 2007), por lo que esta hipótesis no parece tener un fundamento muy fuerte. También se observó, durante la preparación de las dosis, que los pellets correspondientes a la cepa vacuna que expresa c-HpaA/CT2 eran más abundantes que aquéllos correspondientes a la cepa vacuna control. Como se menciona anteriormente, al inducir la expresión de los híbridos se produce una baja de la viabilidad del cultivo, en una unidad logarítmica en el caso de c-HpaA/CT2, lo que implica que al normalizar los cultivos por número de UFC totales, el volumen de cultivo que se debe tomar en la preparación de la dosis es mayor que en el control. Existe la posibilidad que la mayor cantidad de bacterias que hay presentes en las dosis de vacunación, de manera independiente de la cantidad de bacterias viables de ella, sea causal de intoxicación de los ratones, por la presencia de toxinas resultantes de la muerte bacteriana (por ejemplo, LPS). No obstante, aunque la baja de viabilidad bacteriana puede deberse a lisis bacteriana, como en el caso de *E. coli*,

en el caso de *Salmonella* se observa que la densidad óptica no decae (datos no mostrados), por lo que la lisis por sí sola no es suficiente para explicar la disminución de la viabilidad.

En *Salmonella*, a diferencia de *E. coli*, no se dispone de cepas del tipo DE3, que posean en su cromosoma la enzima RNA polimerasa del fago T7, necesaria para expresar proteínas con el sistema pET, por lo que en este trabajo se debió utilizar una cepa que porta, adicionalmente, el plásmido pGP1-2, cuya selección se realiza con kanamicina. El mecanismo de acción de la kanamicina implica la detención de la traducción, pero no causa inmediatamente la muerte de la bacteria, sino que limita su crecimiento, interfiriendo con la síntesis de proteínas. Si la expresión de c-HpaA/CT2 es tóxica para la bacteria, una posible forma de sobrevivencia para las bacterias es evitar la expresión por pérdida del gen de la RNA polimerasa del fago T7, ya sea por inactivación o por pérdida total del plásmido por segregación, siendo esta última opción la más probable. La bacteria podría tolerar una cierta cantidad de kanamicina mientras exista un pool disponible de fosfotransferasa que la inactive, por lo que la pérdida del plásmido pGP1-2 podría ser un evento de no baja frecuencia. En este contexto, al ensayar esta probabilidad en cultivo se observaría una disminución de la viabilidad, pero habría una cierta cantidad de bacterias que no están muertas, sino que sólo son incapaces de crecer en kanamicina al sembrar en placas con este antibiótico.

Se comparó la cantidad de bacterias viables totales respecto a la de resistentes a kanamicina en condiciones similares a las de vacunación y se encontró que la fracción resistente corresponde a un quinto del total, lo que parece consistente con la observación del volumen del pellet, según estimación visual (datos no mostrados). Entonces, en los ratones del grupo vacunado, la carga bacteriana real fue superior a la utilizada en el grupo control, pero aún así se encontraba dentro de un rango similar a ella, a tan solo media unidad logarítmica de diferencia. Esta diferencia por sí sola no es suficiente para explicar la mortalidad observada en el grupo vacuna (47%, versus 23% y 15% en los grupos controles pET y PBS), pues otros estudios utilizan dosis de vacunación con *Salmonella typhimurium* que llegan incluso a 10^{10} bacterias (Kramer y cols., 2003). Es posible que en la dosis exista un cierto número de bacterias inactivas, que si bien no pueden generar una infección, pueden, a través del LPS presente en su membrana externa, ayudar a generar un efecto tóxico. En conjunto, la carga bacteriana total, incluyendo tanto bacterias vivas como muertas, puede haber sido lo suficientemente alta para producir una reacción inmune muy severa, que habría repercutido desfavorablemente en la salud de los ratones del grupo vacuna, probablemente por efecto del lipopolisacárido, endotoxina que en la cepa vacuna utilizada, $\chi 4550$, se encuentra intacta.

En último término, la cantidad mayor de bacterias presente en las dosis utilizadas en los ratones vacunados se debe a la toxicidad inherente que presentaría el híbrido c-HpaA/CT2 para la bacteria. La causa más probable de la

toxicidad, tal como se mencionó anteriormente, es que la secuencia de inserción en membrana de CT2 no sea reconocida eficientemente por las proteínas chaperonas de *Salmonella*, lo que causaría que al menos una cierta proporción del híbrido no se inserte en la membrana externa, o no lo haga correctamente, desestabilizando la estructura de la membrana externa y disminuyendo la viabilidad de la bacteria. Entonces, los problemas de mortalidad acentuada observados en la vacunación podrían ser evitados facilitando el plegamiento de la quimera, ya sea utilizando un híbrido cuyo CT presente una secuencia reconocida por la bacteria hospedero o sobreexpresando el homólogo de *H. pylori* de la chaperona Omp85. En este contexto, además, sería posible lograr una expresión más estable, con la cual tal vez podría inducirse una respuesta inmune más dirigida capaz de erradicar *H. pylori* al momento del desafío.

En este trabajo se ha construido un prototipo de vacuna oral viva, utilizando como vector una cepa de *Salmonella* atenuada. Las vacunas orales vivas tienen la ventaja de contar con un sistema de entrega a la vez de bajo costo y que incorpora intrínsecamente un buen potencial inmunogénico, gracias a la acción adyuvante de la bacteria portadora, que posee la mayoría de sus antígenos, pero es incapaz de producir una infección sistémica, debido a que está atenuada. Un ejemplo histórico de la utilización de bacterias vivas atenuadas administradas por vía oral lo constituye la cepa de *Salmonella typhi* Ty21a, que ha sido utilizada como vacuna contra la fiebre tifoidea con éxito en algunos países como Egipto, el que se obtuvo un 96% de eficacia, (Wahdan y cols., 1982), y con cierta limitación

en el nuestro, en donde se obtuvo un 62% a 78% de eficacia en dos formulaciones distintas (Levine y cols., 1987; Levine y cols., 1999). En este contexto, la presentación en Chile de una vacuna basada en una cepa de *Salmonella* atenuada tendría una ventaja en el proceso de aprobación respecto a otras vacunas, dado que existe ya un precedente de su utilización por las instituciones de salud nacionales. Además, se ha encontrado que una de las principales razones de que se retrase la vacunación de los niños es el miedo que experimentan sus padres o tutores por que sus hijos sean inyectados (Logullo y cols., 2007), por lo que el hecho que esta vacuna sea administrada vía oral es un incentivo a la vacunación.

Finalmente, creemos que las dificultades encontradas durante el desarrollo del ensayo de vacunación pueden ser solucionadas de manera relativamente sencilla, por lo que el prototipo de vacuna probado en este trabajo tiene buenas expectativas en un futuro cercano.

CONCLUSIONES

1. Se logró expresar en membrana externa de la cepa vacuna χ 4550 los híbridos NT/CT2 y c-HpaA/CT2
2. La cepa vacuna X4550 pGP1-2 pET27b asd c-HpaA/CT2 es capaz de inducir respuesta inmune contra el antígeno HpaA, comparado con un control sin bacteria
3. No hubo diferencias significativas en la colonización del estómago por parte de *H. pylori* en los ratones vacunados, respecto de los controles, lo que sugiere que en las condiciones de vacunación ensayadas no hubo efecto profiláctico protector frente al desafío con este patógeno

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 7, 36-42
2. Aebischer T, Bumann D, Epple HJ, Graham DY, Metzger W, Schneider T, Stolte M, Zeitz M, Meyer T (2005). Development of a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 10: 547.
3. Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benaglio M, Tasca E, Azzurri A, D'Elis MM, Del Prete G, de Bernard M (2006). The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J. Clin. Invest.* 116 (4): 1092-101.
4. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 270(30):17771-7.
5. Atrazhev AM, Elliot JF (1996). Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation into *E. coli*. *Biotechniques.* 21: 1024-30.
6. Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF (2000). Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2 (2): 155-64.
7. Baldari CT, Lanzavecchia A, Telford JL (2005). Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol.* 26 (4): 199-207.
8. Björkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. (2000) Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science.* 287(5457):1479-82.
9. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55(10): 2111-5.
10. Blaser, M (2005). The Biology of cag in the *Helicobacter pylori*-Human Interaction. *Gastroenterology.* 128: 1512-15.
11. Blom K, Lundin BS, Bölin I, Svennerholm A (2001). Flow cytometric analysis of the localization of *Helicobacter pylori* antigens during different growth phases. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 30 (3): 173-9.
12. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elis MM, Telford JL, Baldari CT (2003) The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 198(12): 1887-97.
13. Bourzac K, Guillemin K (2005). *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol.* 7: 911-919.

14. Carlsohn E, Nyström J, Bölin I, Nilsson CL, Svennerholm AM (2006). HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. *Infect Immun.* 74: 920-926.
15. Chaturvedi R, Cheng Y, Asim M, Bussière FI, Xu H, Gobert AP, Hacker A, Casero RA Jr, Wilson KT (2004) Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 279(38): 40161-73.
16. Chmiela M, Michetti P (2006). Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter* infection. *Helicobacter* 11 (S1): 21-26.
17. Cooke CL, Huff JL, Solnick JV (2005). The role of genomic diversity and immune evasion in persistent infection with *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45(1): 11-23.
18. Corthésy-Theulaz IE, Hopkins S, Bachmann D, Saldinger PF, Porta N, Haas R, Zheng-Xin Y, Meyer T, Bouzourène H, Blum AL, Kraehenbühl JP (1998). Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium phoP^c* expressing urease A and B subunits. *Infect Immun.* 66 (2): 581-6.
19. D'Elis MM, Andersen LP. (2007) *Helicobacter pylori* inflammation, immunity, and vaccines. *Helicobacter.* 12 (S1):15-9
20. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. (2004). The autotransporter secretion system. *Res Microbiol.* 155(2):53-60.
21. Evans DG, Evans DJ Jr, Moulds JJ, Graham DY (1988). N-Acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect. Immun.* 56(11): 2896-906.
22. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299(5612), 1582-5.
23. Ferreccio C, Rollán A, Harris PR, Serrano C, Gederlini A, Margozzini P, Gonzalez C, Aguilera X, Venegas A, Jara A. (2007) Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(4):662-7.
24. Figueroa G, Acuña R, Troncoso M, Portell DP, Toledo MS, Valenzuela J (1997). *Helicobacter pylori* infection in Chile. *Clin Infect. Dis.* 25(5): 983-989.
25. Fischbach W, Chan AO, Wong BC (2005). *Helicobacter pylori* and gastric malignancy. *Helicobacter.* 10(S1): 34-9.
26. Fischer W, Buhrdorf R, Gerland E, Haas R (2001). Outer membrane targeting of passenger protein by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 69 (11): 6769-75.
27. García de la Guarda, R. (1998). Expresión de antígenos de *Helicobacter pylori* en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*. Evaluación

- preliminar de los antígenos recombinantes en un modelo murino, para el desarrollo de una vacuna oral viva. Tesis para obtener el grado de Magister en Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.
28. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301(5636): 1099-102.
 29. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL, Wilson KT (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(24): 13844-9.
 30. Gobert AP, Cheng Y, Wang JY, Boucher JL, Iyer RK, Cederbaum SD, Casero RA Jr, Newton JC, Wilson KT. (2002). *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J. Immunol.* 168(9): 4692-700
 31. Gómez-Duarte OG, Lucas B, Yan ZX, Panthel K, Haas R, Meyer TF (1998). Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine.* 16(5): 460-71.
 32. Guiraldes E, Peña A, Duarte I, Triviño X, Schultz M, Larraín F, Espinosa MN, Harris P (2002). Nature and extent of gastric lesions in symptomatic Chilean children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Acta Pædiatr.* 91(1): 39-44.
 33. Han SR, Schreiber HJ, Bhakdi S, Loos M, Maeurer MJ (1998). *vacA* genotypes and genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5(2): 139-45.
 34. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M (2005). EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 280: 23130-7.
 35. Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, Russell RG, Wasserman SS, Morris JG Jr (1993). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis.* 168(1): 222-6.
 36. Iiver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279(5349): 373-7.
 37. Jose, J (2006). Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl. Microbial Biotechnol.* 69: 607-14.
 38. Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, Gottrand F, Celinska-Cedro D, Roma-Giannikou E, Orderda G, Kolacek S, Urruzuno P, Martínez-Gómez MJ, Casswall T, Ashorn M, Bodanszky H, Mégraud F (2006). Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut.* 55(12):1711-6

39. Konturek, J. (2003). Discovery by Javorsky of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J. Physiol. Pharmacol.* 54(S3): 23-41.
40. Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT (2003). Autodisplay: Development of an Efficacious System for Surface Display of Antigenic Determinants in Salmonella Vaccine Strains. *Infect Immun.* 71(4): 1944-52
41. Kupcinskas L, Melfertheiner P (2005). *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter* 10(S1): 26-33.
42. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF (1997). A Standardized Mouse Model of Helicobacter pylori Infection: Introducing the Sydney Strain. *Gastroenterology*; 112(4): 1386-97.
43. Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C (2003). *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect.* 5(15): 1345-56.
44. Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Germanier R. (1987) Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet.* 1(8541):1049-52.
45. Levine MM, Ferreccio C, Abrego P, Martin OS, Ortiz E, Cryz S. (1999) Duration of efficacy of Ty21a, attenuated Salmonella typhi live oral vaccine. *Vaccine.* 17(S2):S22-7.
46. Logullo P, de Carvalho HB, Saconi R, Massad E. (2007). Fear of injections is a reason for not to vaccinate their children, say caretakers. *Vaccine.* 26(2):141-3.
47. Lundström AM, Blom K, Sundaeus V, Bölin I (2001). HpaA shows variable surface localization but the gene expression is similar in different *Helicobacter pylori* strains. *Microb Pathog.* 31(5): 243-53.
48. Lundstrom AM, Bolin I, Bystrom M, Nystrom S (2003). Recombinant HpaA purified from Escherichia coli has biological properties similar to those of native Helicobacter pylori HpaA. *APMIS.* 111(3):389-97.
49. Mao YF, Yan J, Xu Y (2006). Immunoprotective effects of *Helicobacter pylori* UreB and HpaA bivalence recombinant vaccine with inner adjuvant on experimental infection in mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 34(5): 405-411.
50. Marshall, BJ (1983). Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1(8336):1273-5.
51. Marshall BJ, Warren JR (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1(8390):1311-5.
52. Martínez, P. (2006). Gen de la citotoxina VacA de *Helicobacter pylori*: genotipos presentes en cepas chilenas y estudios del sistema secretor como modelo presentador de antígenos heterólogos en la superficie de una cepa vacuna. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Genética Molecular y Microbiología. Pontificia Universidad Católica de Chile.

53. Miller, J. (1994). Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* 235: 375-85.
54. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, Montecucco C (1998) Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* 187(1): 135-40.
55. Moran, A.P. (1999) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. *J. Physiol. Pharmacol.* 50(5): 787-805.
56. Müller I, Medina-Selby A, Palacios JL, Martinez P, Opazo P, Bruce E, Mancilla M, Valenzuela P, Yudelevich A, Venegas A (2002) Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. *Biol. Res.* 35(1):67-84.
57. Murakita H, Hirai M, Ito S, Azuma T, Kato T, Kohli Y (1994) Vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, atrophic gastritis and gastric carcinoma patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 6(S1): S29-S31.
58. Nyström J, Svennerholm AM. (2007) Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine.* 25(14):2591-8.
59. Palacios, J. (2006). El sistema de secreción tipo IV codificado en el islote de patogenicidad de *Helicobacter pylori* J99 se ensambla funcionalmente en *Escherichia coli*, confirmando su autonomía operativa. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas mención Genética Molecular y Microbiología. Pontificia Universidad Católica de Chile.
60. Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU (2004) Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 62(5):1557-65.
61. Purcell AW, Gorman JJ (2004). Immunoproteomics: Mass spectrometry-based methods to study the targets of the immune response. *Mol Cell Proteomics.* 3(3):193-208.
62. Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, Meyer TF, Aebischer T (2003). Autodisplay: Efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun.* 71(11): 6320-8.
63. Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J (2006). Assembly Factor Omp85 Recognizes Its Outer Membrane Protein Substrates by a Species-Specific C-Terminal Motif. *PLoS Biol.* 4(11): e377.
64. Robinson K, Loughlin MF, Potter R, Jenks PJ (2005). Host adaptation and immune modulation are mediated by homologous recombination in *Helicobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 191(4): 579-587.

65. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
66. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(25):14559-64.
67. Siavoshi F, Salmanian AH, Akbari F, Malekzadeh R, Massarrat S (2005). Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. *Helicobacter* 10(4): 318-22.
68. Stevenson G, Neal B, Liu D, Hobbs M, Packer NH, Batley M, Redmond JW, Lindquist L, Reeves P (1994). Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its rfb gene cluster. J. Bacteriol. 176(13): 4144-56.
69. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. Mol Microbiol. 43(4):971-80
70. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M (1998). Free recombination in *Helicobacter pylori*. Proc Natl. Acad. Sci. USA 95(21): 12619-24.
71. Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL (2004). Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(20): 7727-32.
72. Sutton P, Doidge C, Pinczower G, Wilson J, Harbour S, Swierczak A, Lee A (2007). Effectiveness of vaccination with recombinant HpaA from *Helicobacter pylori* is influenced by host genetic background. FEMS Immunol Med Microbiol. 50(2):213-9.
73. Tabor S, Richardson C (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1074-1078.
74. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci USA. 76: 4350-4354
75. Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E (2001). The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. J. Clin. Invest. 108(6): 929-37.
76. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. Gut 40(3): 297-301.
77. Volland P, Weeks DL, Vaira D, Prinz C, Sachs G (2002). Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of *Helicobacter pylori*. Aliment. Pharmacol. Ther. 16(3): 533-44.

78. Volland P, Hafsi N, Zeitner M, Laforsch S, Wagner H, Prinz C (2003). Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 71(7): 3837-43.
79. Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299(5604): 262-265
80. Wahdan M, Sérié C, Cerisier Y, Sallam S, Germanier R. (1982) A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty 21a oral vaccine against typhoid: three-year results. *J Infect Dis.* 145(3):292-5
81. Winiecka-Krusnell J, Wreiber K, von Euler A, Engstrand L, Linder E (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.* 34(4): 253-6
82. Yao Y, Tao H, Park DI, Sepulveda JL, Sepulveda AR (2006). Demonstration and characterization of mutations induced by *Helicobacter pylori* organisms in gastric epithelial cells. *Helicobacter* 11(4):272-86.
83. Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, Azuma T, Wada A, Hirayama T, Aburatani H, Hatakeyama M (2005). Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(27): 9661-6.

ANEXO 1

Se secuenció los clones de *E. coli* que portan A17CG/CT2 y A17CJ/CT2 en pET27b, en el servicio de Secuenciación de la P. Universidad Católica (ver *Materiales y Métodos*, punto 22). La secuencia obtenida se tradujo de acuerdo al código de *E. coli*. No se observó codones de bajo uso en *E. coli* ni stops tempranos, hasta un largo del 75% del total del segmento de CagA ya clonado.

A

```

atgggaaaaaattctgcactataccaatccgttaagaatggtgtgaatggaaccctagtc
M G K N S A L Y Q S V K N G V N G T L V
ggtaatgggttatctaaagcagaagccacaactctttctaaaaacttttcggacatcaag
G N G L S K A E A T T L S K N F S D I K
aaagagttgaatgcaaaacttggaatttcaataacaataacaataatggactcaaaaac
K E L N A K L G N F N N N N N N G L K N
agcacagaaccctttatgctaaagtaataaaaagaaagcagggcaagcagctagccct
S T E P I Y A K V N K K K A G Q A A S P
gaagaaccctttacgctcaagttgctaaaaaggtaaatgcaaaaattgaccgactcaat
E E P I Y A Q V A K K V N A K I D R L N
caaatagcaagtggtttgggtggttagggcaagcagtggtgcttccctttgaaaaggcat
Q I A S G L G V V G Q A V G F P L K R H
gataaagttggtgatcttagtaaggtagggcaatcagttagccctgaaccctttatgct
D K V G D L S K V G Q S V S P E P I Y A
acgattgatgactctcggcggacctttccctttgaaaaggcatgataaagttggtgatctc
T I D D L G G P F P L K R H D K V G D L
agcaaggtagggctttcagttagccctgaaccctttatgctacgattgatgatctcggc
S K V G L S V S P E P I Y A T I D D L G

```

B

```

atgggaaaaaattctgcactataccaatccgttaagaatggtgtaaacggaaccctagtc
M G K N S A L Y Q S V K N G V N G T L V
ggtaatgggttatctaaagcagaagccacaactctttctaaaaacttttcggacatcaag
G N G L S K A E A T T L S K N F S D I K
aaagagttgaatgcaaaacttggaatttcaataacaataacaataatggactcgaaaac
K E L N A K L G N S N N N N N N N G L E N
agcacagaaccctttatactcaagttgctaaaaaggtaaaagcaaaaattgaccgactc
S T E P I Y T Q V A K K V K A K I D R L
gatcaaatagcaagtggttgggtgatgtagggcaagcagcgagcttccctttgaaaagg
D Q I A S G L G D V G Q A A S F L L K R
catgataaagttgatgatctcagtaaggtagggctttcagctaaccatgaaccctttac
H D K V D D L S K V G L S A N H E P I Y
gctacgattgatgatctcggcggacctttccctttgaaaaggcatgataaagttgatgat
A T I D D L G G P F P L K R H D K V D D
ctcagtaaggtagggctttcaagggagcaaaaattgactcagaaaattgacaatctcaac
L S K V G L S R E Q K L T Q K I D N L N
cagcgggtatcagaagctaaagcatgtcattttgacaacctagatcaaatgatagacaag
Q A V S E A K A C H F D N L D Q M I D K
ctcaaagattctacaaaaagaatggtgtgaatctatatgttgaaagtgcaaaaagtgc
L K D S T K K N V V N L Y V E S A K K C

```

Figura 14. Secuencia de clones pET27b A17C/CT2 traducida.

- a) Secuencia de A17CG/CT2 clonada en pET27b
- b) Secuencia de A17CJ/CT2 clonada en pET27b

ANEXO 2

Se secuenció uno de los clones de *E. coli* que expresa NTG/CT2 en pET27b, en el servicio de Secuenciación de la P. Universidad Católica (ver *Materiales y Métodos*, punto 22).. Los resultados se alinearon con la secuencia publicada de *cagA* de la cepa J99 (clave de acceso NC_000921), para compararlos (Fig. 15). Se observó que la cepa J99 y, por ende, el híbrido NTJ/CT2, posee una región de 12 nucleótidos extra (enmarcada en la figura).

NTG27/CT2 J99	GGATACAGGTTCTTCCATAAAGAGCTTTTCAGAAATTTGGGGATCAGCGTTACCAAATTTT 60 TGATACAGGTTCTTCCATAAAGAGCTTTTCAGAAATTTGGGACTCAGCGTTACCAAATTTT 360 *****
NTG27/CT2 J99	CACAAGTTGGGTGTCCCATCAAACGATCCGTCTAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAA 120 TATGAATTGGGTGTCCCATCAAACGATCCGTCTAAAATCAACACCCAAAAAATCCGAGG 420 * * *****
NTG27/CT2 J99	TTTTATGGAAAATATCATAACAACCCCTATCCCTGATGATAAAGAAAAGCAGAGTTTTT 180 TTTTATGGAAAATATCATAACAACCCCTATCTCTGATGATAAAGAGAAAGCGGAGTTTTT 480 *****
NTG27/CT2 J99	GAAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATTATCATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCA 240 GAGGTCTGCCAAACAAGCTTTTGCAGGAATTATCATAGGAAACCAAATCCGATCGGATCA 540 ** *****
NTG27/CT2 J99	AAAGTTCATGGGCGTGTGTTGATGAATCCTTGAAAGAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGG 300 AAAATTCATGGGCGTGTGTTGATGAATCCTTGAAAGAGAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGG 600 *** *****
NTG27/CT2 J99	AGGGCCTA-----CTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTCTCTCATTATATT 348 AGAGCCTA[ATGGAGATCCTA]CTGGTGGGGATTGGCTTGATATTTTTTATCATTGTGTT 660 ** *****
NTG27/CT2 J99	TGACAAAAACAATCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTCCCCCAT 408 TAACAAAAACAATCTTCCGATCTCAAAGAAACGCTCAATCAAGAACC-AGTTCCTC-AT 718 * *****
NTG27/CT2 J99	GTCCAACCAGATATAGCCCTACCACCNCGNACATACAAGGCTTACCGCCTGNAAGCT 468 GTCCAACCAGATGTAGCCAC-TACCACCCTGA-CATACAAAGCTTACCGCCTGAA-GCT 775 *****

Figura 15: Alineamiento de un clon de *E. coli* que tiene clonado el híbrido NTG/CT2 en pET27b, con la secuencia publicada de *cagA* de J99
El alineamiento inicia en el codón 100 de J99, que corresponde al 2 en el híbrido, y finaliza en el límite de secuenciación (aproximadamente 500 pb). Se enmarca el segmento extra que presenta la secuencia de J99.

La región extra de 12 nucleótidos de J99 se utilizó para realizar una búsqueda en BLAST. Dentro de los resultados, se encontró sólo 4 secuencias que corresponden a segmentos del gen *cagA* de *H. pylori*, obtenidas en 3 laboratorios diferentes (dos en Asia y otro en Europa), lo que sugiere que la inserción aminoacídica *NGDP* tuvo lugar después de la divergencia de la especie, en alguna cepa ancestral (Fig 16 a). La secuencia de los primeros 500 aminoácidos fue alineada utilizando el software público ClustalW (EMBL – EBI), y el alineamiento obtenido se utilizó para construir un cladograma, utilizando el software asociado (Fig. 16 b). El cladograma agrupó separadamente las secuencias que poseen la

inserción NGDP, lo que sugiere fuertemente que poseen un origen común (Fig. 16 b).

A

NCTC11639	RSAKQAFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKERQEAENGEF	NGDP	TGGDWLDIFLSFVF	225
147c	RSAKQAFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKERQEAENGEF	NGDP	TGGDWLDIFLSFVF	225
147a	RSAKQAFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKERQEAENGEF	NGDP	TGGDWLDIFLSFVF	225
Du52_2	RSAKQAFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKERQEAENGEF	NGDP	TGGDWLDIFLSFVF	220
J99	RSAKQAFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKERQEAENGEF	NGDP	TGGDWLDIFLSFVF	220
NTG/CT2	KSAKQSFAGIIIGNQIRTDQKFMGVFDESLKERQEAENGGP	----	TGGDWLDISLSFIF	117
NCTC11637	KSAKQSFAGIIIGNQIRTDQKFMGVFDESLKERQEAENGEF	----	TGGDWLDIFLSFIF	216
HPAG1	KSAKQSFAGIIIGNQIRTDQKFMGVFDEFLKERQEAENGGP	----	TGGDWLDIFLSFIF	216
ATCC435265	KSAKQSFAGITIGNQIRTDQKFMGVFDEFLKERQEAENGEF	----	TGGDWLDIFLSFVF	216
26695	KSAKQSFAGIIIGNQIRTDQKFMGVFDESLKERQEAENGGP	----	TGGDWLDIFLSFIF	221
J578	RSAKQSFAGIIIGNQIRSDKFMGVFDESLKARQEAENAEF	----	AGGDWLDIFLSFVF	217
OK159	RSAKQSFAGIIIGNQIRSDKFMGVFDESLKERQEAENAEF	----	AGGDWLDIFLSFVF	217
F57	RSAKQSFAGIIIGNQIRSDKFMGVFDESLKARQEAENAEF	----	AGGDWLDIFLSFVF	215
OK212	RSAKQSFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKARQEAENAEF	----	AGGDWLDIFLSFVF	228
CPY3401	RSVKQSFAGIIIGNQIRSDQKFMGVFDESLKERQEAENAGP	----	AGGDWLDIFLSFVF	221

:*.*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * *:*:*:*:*:* * :*:*:*:*:* *:*:*:*:

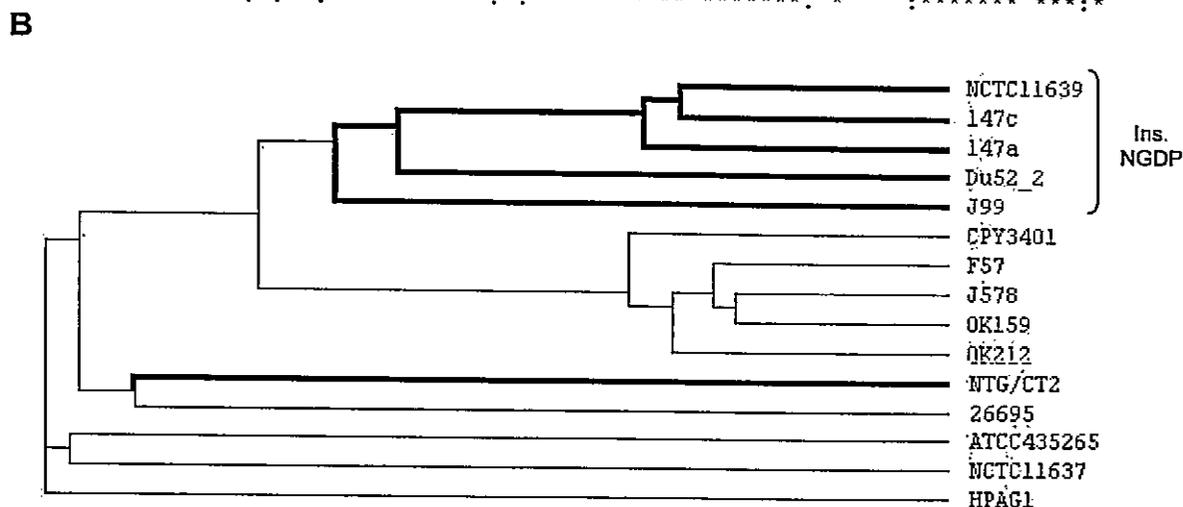


Figura 16: La cepa J99 presenta una inserción poco común de 4 aminoácidos

a) Alineamiento del sector N terminal de la proteína CagA de varias cepas de *H. pylori*, cuyas secuencias son de acceso público, y NTG/CT2. Se destaca el segmento extra que posee J99

* aminoácido idéntico; ; sustitución conservativa; . sustitución semiconservativa

b) Cladograma construido a partir del alineamiento anterior. Se destaca con línea gruesa y llave el grupo que presenta la inserción, y sólo con línea gruesa el híbrido NTG/CT2