

DISEÑO DE ADYUVANTES ESPECÍFICOS DE MUCOSA BASADOS EN LA FUSIÓN DE ANTÍGENOS A SUBUNIDADES DE TOXINAS BACTERIANAS

Eugenio Román-Calderón¹, Cristina Rodríguez-Padilla¹, Roberto Montes de Oca¹, Vicente Madrid-Marina², Reyes Támez-Guerra¹, Juan M. Alcocer-González¹. ¹Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apartado postal # 46 "F", Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. y ²Departamento de Virología Molecular, CISEI, INSP. Fax: 83524212, e-mail: jalcocer@ccr.dsi.uanl.mx

Palabras claves: genes de fusión, E7 de HPV16, toxinas bacterianas, A2B, cry1Ac.

Introducción En el diseño de vacunas, el uso de adyuvantes de origen bacteriano representa una prometedora estrategia para inducir inmunidad local en mucosa. El diseño de genes de fusión que codifican para proteínas de patógenos y toxinas bacterianas capaces de estimular la inmunidad a nivel de mucosa específica de antígeno representa una de las mejores alternativas en el diseño de vacunas, ya que las quimeras recombinantes pueden ser producidas en un vehículo apropiado como una sola proteína en grandes cantidades. La toxina de cólera y la toxina Cry1Ac de B.t. HD-73 han demostrado ser potentes adyuvantes en mucosas (1,2).

En el presente estudio, se presentan resultados sobre la construcción de genes de fusión entre el gen de la proteína oncogénica E7 de virus del papiloma humano, HPV16 y los genes de las toxinas bacterianas: A2B de cólera y la toxina y los distintos dominios de cry1Ac de la bacteria entomopatogénica *Bacillus thuringiensis*(B.t.) HD-73.

Material y Metodos. Se establecieron las condiciones del PCR y se amplificaron el gen E7 de HPV16, A2B de la toxina de cólera, así como la toxina (DI-DIII) y los dominios (DI, DII, DIII y DI-II) de B.t. HD-73. Los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar dichos genes contienen los siguientes sitios de restricción: para E7, en 5' KpnI y en 3' SacII; para las toxinas bacterianas y sus dominios, en 5'SacII y en 3'ApaI. Este diseño permite la construcción E7-toxinas bacterianas. Todos los productos de PCR fueron purificados de geles de agarosa y clonados en el vector pGEMT como productos de PCR. Se determinó la orientación 5'-3' del gen E7 e indistintamente para las toxinas bacterianas con AccI en pGEMT. El gen E7 fue liberado con los sitios KpnI y ApaI y las toxinas bacterianas con los sitios SacII y ApaI. El gen E7 fue posteriormente sub-clonado en el vector pcDNA3 en los sitios KpnI y ApaI, y dicho vector (E7-pcDNA3) fue linearizado con SacII y ApaI para poder llevar a cabo las 2 fusiones. La construcción E7-A2B en pcDNA3 fue caracterizada con la enzima AccI, el fragmento liberado con KpnI y ApaI y subclonado nuevamente en el vector de expresión pPICZA para la levadura *Pichia pastoris*. Las construcciones a la toxina de cry1Ac y sus dominios se llevaron a cabo en E7-pcDNA3, aunque también se tuvo la posibilidad

de hacerlo directamente en E7-pPICZA. Las cepas de *Escherichia coli* DH5 y Topo 10, fueron usadas para la transformación con las distintas construcciones genéticas.

Resultados. Se amplificaron por PCR 7 fragmentos de DNA con los siguientes tamaños incluyendo los iniciadores: E7:315 pb, A2B:532 pb, DI:780 pb, DII:643 pb, DIII:827 pb, DI-DII:1398 pb y DI-DIII:2200 pb. Todos estos productos fueron clonados en pGEM-T, donde fueron caracterizados con AccI y liberados con los sitios para las enzimas de restricción agregados: KpnI, SacII y ApaI. Todos los productos liberados de pGEMT fueron purificados por genclon III antes de su clonación en pcDNA3. E7 fue clonado con los sitios KpnI y ApaI en pcDNA3 con dirección 5' y 3' respectivamente, lo que permitió la fusión de A2B con SacII y ApaI en 3' de E7. De igual manera sucedió para la toxina y los dominios de cry1Ac. E7-A2B en pcDNA3 fue caracterizado con AccI y liberado el fragmento con KpnI y ApaI, el que fue nuevamente subclonado en pPICZA con esos mismos sitios. La presencia del inserto en este plásmido de expresión se confirmó al liberar el inserto con las mismas enzimas con las que fue subclonado.

Conclusiones. La estrategia planteada para hacer fusiones de genes entre antígenos y subunidades de toxinas bacterianas, puede ser aplicada para desarrollar adyuvantes para otros patógenos de mucosas genitales, intestinales.

Bibliografía.

- 1.- M. Marinaro, P.N.Boyaka, R.J.Jackson, F.D.Finkelman, H Kiyono, E. Jirillo and J.R. McGhee.1999. Use of Intranasal IL-12 to target predominantly Th1 responses to nasal and Th2 responses to oral vaccines given with cholera toxin. J. of Immunol. 162:114-121
- 2.- R.I. Vazquez-Padron, I.Moreno-Fierros, I.Neri-Bazán, A.F. Martínez-Gil, G.A. de la Riva and R.López-Revilla.2000. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 33: 147-155