

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio cholerae*

Gustavo Falero, Boris L. Rodríguez*, Irelio Rodríguez, Edith Suzarte*, Oscar Otero, Niury Núñez, Daily Serrano, Rosa L. Solís, Arlenis Moreno* y Rafael Fando*.

Departamento de Anticuerpos Monoclonales. Instituto Finlay, Ave. 27, No. 19805, La Lisa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 16017, Código Postal 11600, Cuba. * Departamento de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25, No. 15802, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6412, Cuba.

Recibido: 7 de noviembre de 2006. Aceptado: 8 de diciembre de 2006.

Palabras clave: Anticuerpos Monoclonales, OmpU y *Vibrio cholerae*.
Key words: Monoclonal Antibodies, OmpU and *Vibrio cholerae*.

RESUMEN. La proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio cholerae* es la más abundante en la superficie de los vibriones, y se piensa que debe jugar un importante papel en la patogenia de este microorganismo, ya que su expresión es regulada por el mismo sistema que regula la expresión de los dos principales factores de patogenia del microorganismo: la toxina colérica y la pilina corregulada con la toxina. Con el objetivo de poder estudiar la OmpU de *Vibrio cholerae*, se generaron anticuerpos monoclonales (AcM) específicos contra ella. El antígeno utilizado para la obtención de elevados títulos de anticuerpos específicos en el suero de ratones BALB/c, fue la OmpU purificada de *Vibrio cholerae* fusionada a 6 histidinas. En la generación de los hibridomas se emplearon procedimientos normalizados de fusión celular. Los análisis primarios y secundarios de los híbridos generados se realizaron mediante la técnica de inmunoensayo de enzima ligada (ELISA), mientras que la caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos se hizo utilizando las técnicas de *Western blot* y ELISA. También se obtuvo fluido ascítico en ratones BALB/c para producir los anticuerpos monoclonales, los cuales se purificaron mediante Cromatografía de Afinidad. Se obtuvieron y caracterizaron cuatro hibridomas productores de AcM. Los hibridomas 1F11 y 1B10 secretaron anticuerpos de la clase IgM mientras que el 3D8 y el 9H12 secretaron anticuerpos de la clase IgG1. Todos los AcM reconocen una proteína de 42 kDa en *Western blot* correspondiente al producto del gen *OmpU* fusionado a una cola de 6 histidinas. Adicionalmente, el AcM secretado por el hibridoma 3D8 parece ser específico para un epítopo oculto en la OmpU, ya que no reconoce la proteína intacta en la superficie de *Vibrio cholerae*. Este es el primer reporte de producción de anticuerpos monoclonales específicos contra la OmpU de *Vibrio cholerae*.

ABSTRACT. The most abundant surface protein of *Vibrio cholerae* is the outer membrane protein U (OmpU) and is believed to play an important role in the pathogenesis of the microorganism, due to its expression is regulated by the same system that regulate the production of cholera toxin and the toxin-coreregulated pilus, the main virulence factors of *Vibrio cholerae*. With the aim to study the OmpU of *Vibrio cholerae*, specific monoclonal antibodies (Mabs) to this protein were generated. BALB/c mice were immunized with a purified OmpU of *Vibrio cholerae* fusing to six histidines, giving high serum titles specific to OmpU in all mice. Standard cellular fusion procedures were used to generate the hybridomas and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze all of them. Characterization of the obtained Mabs was made by *Western blot* and ELISA. Mabs were produced in ascites fluid and puri-

fied using affinity chromatography. Four hybridomas were obtained and characterized. Hybridomas 1F11 and 1B10 secreted antibodies of the IgM class, while Mabs from the hybridomas 3D8 and 9H12 belong to the IgG1 isotype. All Mabs recognize a 42 kDa antigen in *Western blot* corresponding to the product of the OmpU gene fused to a six Histidine tail. Additionally, Mabs produced by 3D8 selectively recognized a hidden epitope in the OmpU, due to the Mab did not recognize the intact protein in the surface of *Vibrio cholerae*. This is the first report for the production of specific Mabs to *Vibrio cholerae* OmpU.

INTRODUCCION

La tecnología de Anticuerpos Monoclonales se ha desarrollado ampliamente después de su descubrimiento por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975,¹ y constituye una poderosa herramienta que ha revolucionado el uso de las inmunoglobulinas en los campos de la investigación básica, el diagnóstico, la inmunoterapia y los procesos industriales. Cada año aumentan significativamente los reportes de nuevos AcM obtenidos en todo el mundo contra una inmensa variedad de antígenos, lo cual avala la extraordinaria importancia de esta

Correspondencia:

Boris L. Rodríguez. Departamento de Genética, CNIC, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba. Teléfono: 208 52 del 36 al 42, Ext. 312. Fax: 208 04 97.
Correo electrónico: boris.rodriguez@cnic.edu.cu

tecnología y su infinita aplicación en el desarrollo actual de las ciencias biomédicas y biotecnológicas.²

Las porinas son importantes constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y además, constituyen hasta el 2% del contenido total de proteínas de la célula.³ La OmpU es una porina de membrana externa de *Vibrio cholerae* (*V. Cholerae*),⁴ el agente causal del cólera,⁵ que figura como una banda de 38 kDa en electroforesis en geles de poliacrilamida, cuya expresión está regulada positivamente por un regulador transcripcional denominado ToxR.⁶ El hecho de que OmpU se exprese paralelamente con los factores de virulencia más importantes del microorganismo, como la toxina colérica (CT) y el pelo corregulado con la toxina (TCP), sugiere un papel de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad.

Dentro de las funciones ya identificadas para OmpU están la de porina de difusión, que confiere resistencia a la bacteria frente a detergentes aniónicos como la bilis,⁷ y la de potencial adhesina involucrada en la colonización de las células epiteliales.⁸ Esto, unido a la evidencia de que sueros de voluntarios inmunizados con cepas candidatas vacunales contra el cólera reconocen OmpU,⁸ reafirma que esta proteína se expresa *in vivo*, lo que la convierte en muy interesante para el estudio de la patogenia de *V. cholerae*.

Las proteínas de membrana externa también se han utilizado en algunas aplicaciones prácticas, al fusionar diferentes productos génicos a porinas de membrana como: OmpC⁹ PhoE¹⁰ y LamB¹¹ de diversos microorganismos.

Teniendo en cuenta la importancia del estudio de la OmpU de *V. cholerae* para la mejor comprensión de la patogenia de este microorganismo, el presente trabajo tiene como objetivos: obtener hibridomas productores de AcM contra la OmpU de *V. cholerae*, y realizar una caracterización preliminar de los AcM obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de *V. cholerae* y condiciones de cultivo

Se emplearon las cepas de *V. cholerae* N16961 y C6706 (El Tor, Inaba) y C7258 (El Tor, Ogawa). Todas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) (triptona, 1 %, extracto de levadura 0,5 %, cloruro de sodio 1 %) a 37 °C durante toda la noche. Opcionalmente se añadió agar (1,5 %) al LB para preparar medio sólido.

Inmunización de ratones BALB/c

Ratones hembras de cuatro semanas de nacidos con aproximadamente 25 g de peso, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), fueron inmunizados por vía subcutánea con 20 µg de OmpU-r, emulsionados en adyuvante de Freund (Sigma). Los animales recibieron 4 inyecciones administradas cada 14 d. Entre 7 y 10 d posteriores a la última inyección, se le extrajo sangre para la evaluación en suero de anticuerpos específicos mediante ELISA.

ELISA para la detección de anticuerpos anti OmpU-r

Para la detección de anticuerpos específicos en los sueros o sobrenadantes de los cultivos de híbridos se empleó un sistema inmunoenzimático tipo ELISA. Se recubrieron placas *High Binding* (Costar) con 100 µL/pozo de una suspensión de células de *V. cholerae* (D.O._{600 nm} = 0,1) y se incubaron toda la noche a 37 °C, u OmpU-r a una concentración 1 µg/mL incubándose toda la noche a 4 °C. Para evitar reacciones inespecíficas, se bloquearon los pozos con una disolución de leche descremada (Oxoid) al 2 % en PBS durante 1 h a 37 °C. Se añadieron a los pozos 100 µL de los sueros de los animales inmunizados (en diluciones entre 1/1000 - 1/10000) o los sobrenadantes de cultivo sin diluir para su evaluación. Se emplearon como controles negativos sobrenadantes de hibridomas secretores de AcM contra antígenos no relacionados. Las muestras se incubaron 2 h a 37 °C. Después de varios lavados con PBS-Tween 20 al 0,05 % (PBS-T), se incubó durante 1 h a 37 °C con anti IgG de ratón (molécula completa) conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido apropiadamente en PBS-T y 1 % de leche descremada. Después de varios lavados, la reacción se reveló con 100 µL/pozo de orto-fenilendiamina al 0,04 % en disolución reguladora citrato (pH = 5), que contenía 0,05 % (v/v) de H₂O₂ al 30 %. La reacción de detuvo con 50 µL/pozo de H₂SO₄ 2,5 N. Para medir la absorbancia se empleó un lector de microELISA (Labsystems Multiskan^R Multisoft) a una longitud de onda de 492 nm.

Fusión celular, clonaje por dilución limitante y criopreservación de los clones de interés

Se seleccionaron los animales con los mayores títulos de anticuerpos específicos en suero, y se realizó una última inyección intravenosa 3 días

antes de la fusión celular, con 10 µg de OmpU-r en 100 µL de PBS. Se empleó el bazo como fuente de linfocitos y se utilizó la línea de mieloma SP₂/O para realizar las fusiones celulares con polyethylene glycol 1300 (Sigma, Hybri-Max), según la descripción de Campbell.¹² Las células híbridas con capacidad para producir AcM específicos para el antígeno de interés fueron seleccionadas mediante el ensayo descrito con anterioridad. Los hibridomas positivos fueron clonados y reclonados por la técnica de dilución limitante, y congelados en nitrógeno líquido en presencia de 10 % de dimetil sulfoxido y suero fetal bovino.

Caracterización de los AcM obtenidos

Determinación de isotipo

La clase y subclase de los AcM obtenidos se estableció mediante un juego de reactivos para determinación de isotipo de AcM de ratón (Sigma ImmunoTypeTM Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit), según las instrucciones del fabricante.

Análisis de especificidad mediante Western blot

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 % en presencia de sodio dodecil sulfato¹³ a lisados celulares (obtenidos por tratamiento térmico de 10 min a 100 °C) de suspensiones de vibriones (D.O._{600 nm} = 0,5) de las cepas de *V. cholerae* en estudio y la OmpU-r. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amershan) de 0,45 µm según Towbin.¹⁴ Después de bloquear con leche descremada al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente (TA), las muestras (sobrenadantes de cultivo) fueron añadidas y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se lavaron las membranas con PBS-T y se incubaron durante 1 h a TA con anti IgG de ratón (molécula completa) conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido apropiadamente. La reacción se reveló con diaminobencidina (0,2 mg/mL) (Sigma) y 0,4 % de H₂O₂ en PBS, pH = 7,4.

Producción de los AcM en fluido ascítico y purificación de los mismos

Varios grupos de ratones BALB/c, con las mismas características descritas anteriormente, fueron pretratados con 0,5 mL de Pristane (Sigma) para irritarles el peritoneo, y 7 a 10 d después se les inoculó intraperitonealmente

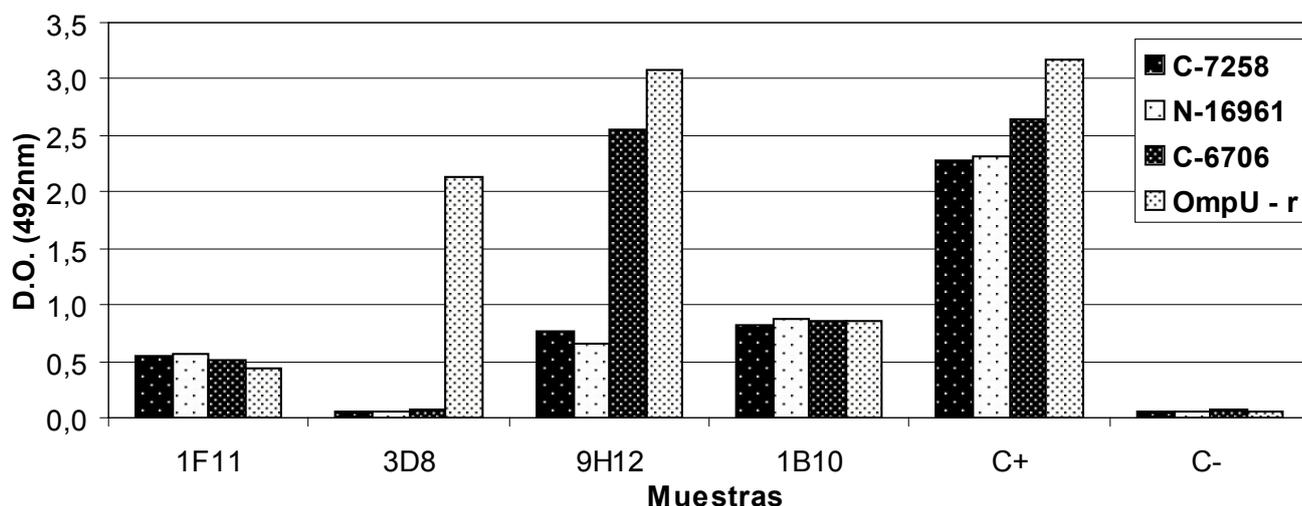


Fig. 1. Reactividad de los clones seleccionados en ELISA. Se utilizó como recubrimiento la OmpU-r o diferentes cepas de *V. cholerae*. (C+) Control positivo consistente en sobrenadante de linfocitos utilizados para la fusión celular. (C-) Control negativo consistente en PBS.

Tabla 1. Características de los AcM obtenidos en cuanto a especificidad e isotipo.

Clon	ELISA		Western blot		Isotipo
	Células completas*	OmpU-r	Células tratadas**	OmpU-r	
1F11	+	+	+	+	IgM
3D8	-	+++	++	++	IgG1
9H12	++	+++	++	++	IgG1
1B10	++	+	++	++	IgM

* Tres cepas diferentes de *V. cholerae* (D.O.600 nm = 0,1) empleadas directamente como recubrimiento en los ensayos de ELISA. ** Tres cepas diferentes de *V. cholerae* (D.O. 600 nm = 0,5) tratadas 10 min a 100 °C y empleadas como fuentes de antígenos en los ensayos de Western blot.

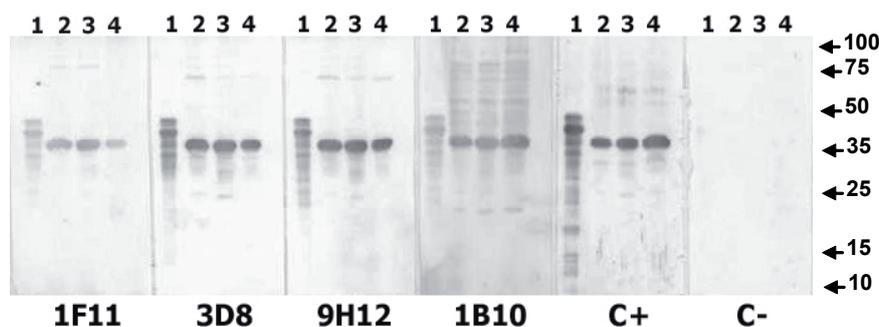


Fig. 2. Análisis por Western blot de la especificidad de los 4 clones seleccionados frente a: carril 1, OmpU-r; carril 2, C7258; carril 3, N16961; carril 4, C6706. Las muestras se hirvieron en presencia de SDS. (C+) Control positivo consistente en sobrenadante de linfocitos utilizados para la fusión celular. (C-) Control negativo consistente en PBS. A la derecha se indica la zona de bandeo del patrón de peso molecular empleado (Promega), los valores que se muestran están en kilodalton (kDa).

1 mL de suspensiones celulares (1 a 2 · 10⁶/mL) de cada uno de los hibridomas obtenidos. El fluido ascítico fue extraído del peritoneo, centrifugado y almacenado a -20 °C hasta su uso. La purificación de los AcM se realizó mediante cromatografía de afinidad en matriz de Proteína A sepharose fast flow (Amershan Pharmacia).¹⁵

RESULTADOS Y DISCUSION
Generación de hibridomas productores de AcM específicos para OmpU-r.

Los sobrenadantes de los híbridos con crecimiento en cultivo, se tamizaron para detectar la producción de anticuerpos contra OmpU-r mediante un ELISA directo, utili-

zando como recubrimiento la proteína purificada. De los 924 pozos sembrados con las suspensiones celulares resultantes de la fusión, 601 tuvieron crecimiento, para un 65 % de eficiencia de fusión. Mientras que de los 601 pozos crecidos, 497 fueron tamizados por ELISA y 34 resultaron tener anticuerpos específicos para la OmpU-r en el sobrenadante. Lo anterior rindió una eficiencia de fusión del 6,84 %, lo cual está entre los parámetros establecidos para este procedimiento.¹² Es de destacar la alta positividad lograda en la fusión, lo que avala el adecuado esquema de inmunización aplicado a los ratones y la buena calidad del antígeno empleado. De los híbridos positivos obtenidos se seleccionaron 4 según su reactividad en Western blot contra la Ompu-r purificada y sus características de crecimiento en cultivo. Estos híbridos se clonaron por dilución limitante, se estabilizaron en cultivo y se criopreservaron en nitrógeno líquido. El sobrenadante de cultivo de los mismos se cosechó y se utilizó para la posterior caracterización de los AcM escogidos.

Los 4 clones seleccionados producen AcM que reconocen la OmpU-r purificada en ELISA (Fig. 1), no ocurriendo lo mismo en el ELISA de células completas de los vibriones, en los que el AcM 3D8 es incapaz de reaccionar (Fig. 1). Se hizo necesario entonces realizar un análisis de la especificidad de estos AcM mediante la técnica de Western blot (Fig. 2), donde se pudo observar que los 4 AcM seleccionados reconocen tanto la OmpU-r purificada como una banda de proteína de 38 kDa (correspondiente a la OmpU no recombinante)

en tres cepas diferentes de *V. cholerae*, incluyendo la cepa N16961 de donde se clonó el gen *ompU*. De estos resultados podemos concluir que 3 de los 4 AcM generados reconocen la OmpU de cepas de *V. cholerae*, tanto en su forma nativa como desnaturalizada. El AcM 3D8 al parecer es específico para un epítipo oculto en la proteína, ya que es incapaz de reaccionar contra la proteína expresada en la superficie de las células intactas de *V. cholerae* en ELISA (Fig. 1), pero reconoce tanto la proteína recombinante como la OmpU procedente de tres cepas de *V. cholerae* en los experimentos *Western blot* (Fig. 2), que son las mismas cepas empleadas en los ensayos de ELISA con células completas. Lo anterior indica que el epítipo reconocido por el 3D8 está en las dos OmpU, la recombinante y la natural, por lo que no es un epítipo exclusivo de la proteína recombinante.

En este trabajo se realizó un análisis preliminar general de los AcMs obtenidos, que permitió conocer sus principales características (Tabla 1). Sin embargo, para la completa caracterización de estos AcMs, se tendrá que profundizar en el estudio de la especificidad de epítopos y la determinación de la constante de afinidad de cada uno de ellos, para lo cual será necesario diseñar nuevos experimentos.

CONCLUSIONES

Se generaron por primera vez hibridomas productores de AcM contra la proteína de membrana externa U (OmpU) de *V. cholerae*.

Dada la especificidad de los AcM generados, estos serán de gran utilidad para estudiar las funciones de la OmpU en la patogenia del cólera.

BIBLIOGRAFIA

1. Köler G. and C. Milstein. Continuous cultures of fuses cell secreting antibodies of predefined specificity. **Nature**, **256**, 495-501, 1975.
2. Gavilondo J.V. Anticuerpos policlonales y monoclonales. Anticuerpos Monoclonales. J.V. Gavilondo (ed.), Elfos Scientiae, La Habana, 25-38, 1995.
3. Nikaído H. and Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiol. Rev.**, **49**, 1-12, 1985.
4. Benz R., Maier E. and Chakraborty T. Purification of OmpU from *Vibrio cholerae* classical strain 569B, evidence for the formation of large cation-selective ion-permeable channels by OmpU. **Microbiology**, **13**, 321-328, 1997.
5. Kaper J.B., Morris J.G. and Levin M.M. *Cholera*. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**, 48-56, 1995.
6. Crawford J.A., Kaper J.B. and DiRita V.J.. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of OmpU, the gene encoding the major envelope protein in *Vibrio cholerae*. **Mol. Microbiol.**, **29**, 235-244, 1998.
7. Wibbenmeyer J.A., Provenzano D., Landry C.F., Klose K.E. and Delcour A.H. *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT porins are differentially affected by bile. **Infect. Immun.**, **70**, 121-127, 2002.
8. Sperandio V., Giron J., Silveira W.D. and Karper J. The OmpU Outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.**, **63**, 4433-4439, 1995.
9. Puente J.L., Juárez D., Bobadilla M., Areas C.F. and Calva E. The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequence. **Gene**, **156**, 1-8, 1995.
10. Hogervoist E.J., Agtenberg M., Wagenaar J.P., Adriaanse H., Boog C.J., Van De Zee R., Van Embden J.D., Van Eden W. and Tommassen J. Efficient recognition by rat T cells clones of mycobacterial hsp65 inserted in *Escherichia coli* outer membrane protein PhoE. **Eur. J. Immunol.**, **20**, 2763-2771, 1990.
11. Su G.F., Brahmabhatt H.N., Wehland J., Rohde M. and Timmis K.N. Construction of stable LamB-Shiga toxin B subunit hybrids: analysis of expression in *Salmonella typhimurium* aroA strains and stimulation of B subunit specific mucosal and serum antibody responses. **Infect. Immun.**, **60**, 3345-3353, 1992.
12. Campbell A.M. Fusion Procedures, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Monoclonal Antibody Technology. Burdon R.H., and Knippenberg P.H. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, New York and Oxford, 120-134, 1984.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-686, 1970.
14. Towbin H., Staehlin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**, 4350-4355, 1979.
15. Tu Y.Y., James P.F. and Goldenberg D.M. Temperature affect binding of murine monoclonal IgG antibodies to protein A. **J. Immunol. Meth.**, **109**, 43-49, 1998.